

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CRYOCONSERVATION D'UNE LIGNÉE CELLULAIRE SÉCRÉTRICE  
D'INSULINE, LES INS 832/13, À L'AIDE D'UNE FORMULATION À BASE DE  
PROTÉINES DE BLÉ

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

ISABELLE ROBINSON

DÉCEMBRE 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL Service des bibliothèques

*Avertissement*

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, (l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de (son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, (l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*Je dédie ce mémoire à toutes les personnes qui ont embelli ma vie par leur présence,  
leur amour inconditionnel, leur force, leur soutien et leur foi inébranlable en moi.*

*J'ai une chance inouïe car vous avez été et êtes fort nombreux, entre la famille  
immédiate, ceux et celles qui ont croisé mon chemin l'espace d'un instant, les  
disparus ou ceux qui sont encore là aujourd'hui à mes côtés. J'espère un jour  
pouvoir être là pour vous comme vous l'avez été pour moi. Je ne vous oublie pas.*

*Merci.*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice Mme Diana Averill pour sa précieuse collaboration pendant cette maîtrise et pour l'aide qu'elle m'a apporté au fil de ces années. Je mentionne également l'aide apportée par mon co-directeur M. Fathey Sarhan. Un merci également à M. François Ouellet qui a largement contribué à ce projet. Un merci à Mélanie Grondin et Mohamed Ali Benali pour leur encadrement et pour avoir contribué à ma formation. Plusieurs autres personnes ont été impliquées dans la réalisation de ce projet et méritent d'être citées, Sonia Do Carmo et Catherine Mounier. Merci à Normand Chevrier pour m'avoir laissé utiliser son laboratoire. Je remercie également les différentes personnes des laboratoires avoisinants qui ont su à un moment ou à un autre m'aider dans les difficultés rencontrées. Merci à M. Denis Flipo pour ses nombreux et précieux conseils. Je remercie le Centre du Diabète de Montréal pour m'avoir accueilli dans ses locaux et pour le temps qu'ils ont consacré à ma formation. Je remercie les autres membres de mon laboratoire pour leur présence et leur soutien, Audrey Glory et Pragathi Pallepatti. Un merci tout particulier à Mme Francine M. Mayer, qui non seulement m'a fait confiance pour être sa démonstratrice de génétique mais qui est aussi devenue une amie dont le soutien est inestimable. Je remercie M. François Dragon pour son aide logistique. Je remercie également les organismes subventionnaires suivants : le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC).

Je remercie ma famille, notamment ma mère Danielle et mon frère Stéphane pour leur gentillesse et leur soutien au fil de ces années. Une pensée spéciale pour Patrick Jan Cejka, mentor et ami, parti trop tôt et sans avoir réalisé le rôle important qu'il a joué dans ma vie, particulièrement après le décès de mon père. Un merci à Claire et Claudine, pour votre douceur et votre écoute, je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi. Et un dernier merci à mon partenaire de vie, pour sa présence et son précieux soutien.



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	x
RÉSUMÉ .....	xiv
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
INTRODUCTION .....	1
1.1 Le diabète de type I.....	1
1.2 Traitements du diabète de type I (insulino-dépendant).....	3
1.3 Le diabète de type II.....	3
1.4 Limites des thérapies actuelles.....	4
1.5 La greffe de pancréas .....	5
1.6 La transplantation d'îlots de Langerhans .....	5
1.7 Histoire de la transplantation d'îlots de Langerhans.....	6
1.8 Avantages et inconvénients de la transplantation d'îlots de Langerhans.....	8
1.9 Le pancréas.....	10
1.9.1 Histologie du pancréas.....	10
1.9.2 Histologie des îlots de Langerhans .....	10
Les cellules alpha.....	11
Les cellules bêta.....	11
Les cellules D .....	12

1.9.3 Production et sécrétion de l'insuline par la cellule $\beta$ pancréatique .....	12
1.9.4 Le C-peptide et l'insuline .....	13
1.9.5 Gènes et protéines associés au métabolisme et fonctions des cellules $\beta$ ..	14
1.10 La cryoconservation .....	15
1.10.1 Bases fondamentales de la cryoconservation .....	15
1.10.2 Substances cryoprotectrices courantes .....	17
1.10.3 Méthodes de cryopréservation testées sur des îlots de Langerhans.....	18
1.10.4 Toxicité et limites des méthodes actuelles de cryoconservation des îlots de Langherans .....	20
1.11 Vers de nouveaux cryoprotecteurs : les protéines de blé d'hiver.....	21
1.11.1 Le blé d'hiver.....	21
1.11.2 Les protéines de tolérance au gel.....	23
1.12 Hypothèse de travail et objectifs .....	28
1.13 Modèles biologiques .....	29
1.14 Protocole optimisé de cyroconservation pour la lignée cellulaire INS832/13 ....	32
CHAPITRE II	
ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	34
2.1 Résumé.....	36
2.2 ABSTRACT .....	37
2.3 INTRODUCTION .....	38
2.4 MATERIALS AND METHODS .....	40
2.4.1 Preparation of Plant Protein Extracts.....	40
2.4.2 Cell Culture.....	40
2.4.3 Cell Cryopreservation.....	41
2.4.5 Cell Viability .....	42
2.4.6 Cell Adhesion .....	42

2.4.7 Cellular Morphology .....	43
2.4.8 Glucose-Induced Insulin and C-Peptide Secretion .....	43
2.4.9 Glucose Uptake.....	43
2.4.10 RNA Extraction and Semi-quantitative RT-PCR.....	44
2.5 Statistical analysis .....	44
2.6 RESULTS .....	45
2.6.1 Wheat protein extracts can efficiently cryopreserve INS832/13 cells.....	45
2.6.2 Preincubation with lipids prevents membrane protein coating and improves post-thaw viability and adhesion of INS832/13 cells.....	46
2.6.3 Metabolic functions are maintained in INS832/13 cells cryopreserved with the optimized WPE formulation.....	48
2.6.4 Expression of key genes associated with pancreatic functions is comparable between fresh cells and those cryopreserved with the WPE formulation .....	49
2.7 Discussion .....	50
2.8 ACKNOWLEDGMENTS .....	56
2.9 FIGURE CAPTIONS.....	57
2.10 FIGURE FOR SUPPLEMENTARY DATA .....	64
CONCLUSION ET PROSPECTIVES .....	69
RÉFÉRENCES.....	76

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Ilots de Langerhans.....	11
1.2 Effets cellulaires avec ou sans cryoconservateurs.....	16
1.3 Cellules INS832/13.....	31
2.1 A wheat protein extract (WPE) can replace Me <sub>2</sub> SO as a cryoprotectant for INS832/13 cells.....	57
2.2 Morphology of fresh and cryopreserved INS832/13 cells.....	58
2.3 Viability of INS832/13 cells cryopreserved with WPE is enhanced by preincubation with lipids.....	59
2.4 Viability of INS832/13 cells cryopreserved with WPE is enhanced by preincubation with lipid-containing mixtures.....	60
2.5 Pancreas-associated metabolic activities are enhanced in INS832/13 cells cryopreserved with WPE and lipid-containing mixtures compared to Me <sub>2</sub> SO.....	61-62
2.6 Expression levels of genes associated with pancreatic metabolic functions in INS832/13 cells cryopreserved with the WPE formulation are similar to those of fresh cells.....	63
2.7 WPE does not affect insulin secretion of INS832/13 cells.....	64
2.8 Glucose uptake in INS832/13 cells cryopreserved with WPE and a lipid mixture is similar to fresh cells.....	65

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Supplementary Table S1: Primers used for gene expression analysis using semi-quantitative RT-PCR.....	66
Supplementary Table S2: Different buffers used to wash cells cryopreserved with WPEs immediately after thawing.....	67
Supplementary Table S3: Influence of different oils on adherence and cell membrane protein coating of cells cryopreserved with WPEs or Me <sub>2</sub> SO.....	68

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

2D-LC	Chromatographie à deux dimensions
AcWPE	Extrait de protéines de blé, partiellement purifié avec l'acétone
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFP	<i>Anti-Freeze Protein</i> ou protéine antigel
ANOVA	Analyse de la variance
ApoD	Apolipoprotéine D
APX	Ascorbate peroxydase
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASK-1	<i>Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1</i> ou kinase-1 inductrice de l'apoptose
ATP	Adénosine triphosphate
BD	Becton Dickinson
Blc	Lipocaline bactérienne
BSA	<i>Bovine Albumine Serum</i> ou albumine de sérum bovin
BXT	Composé mimétique de la glutathion peroxydase (GPx)
C-AFGP	<i>C-Linked Antifreeze Glycoprotein</i> ou protéine antigel liée à C
CDA	<i>Canadian Diabetes Association</i> ou Association canadienne du diabète
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CPA	<i>Cryoprotective Agent</i> ou agent cryoprotecteur
CsA	Cyclosporine A
CYP	Cytochrome P450
DHN	Déhydrines
DID	Diabète insulino-dépendant
DMSO	<i>Diméthylsulfoxyde</i>
DOPC	1,2-Dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ou dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FBS	<i>Fœtal Bovine Serum</i> ou sérum de veau fœtal
FAS	Protéine transmembranaire, APO-1 ou CD95
FTP	<i>Freezing Tolerance Proteins</i> ou protéines de tolérance au gel
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
Glut	<i>Glucose Transporter</i> ou transporteur de glucose
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyle)-1-pipérazine éthane sulfonique
HEPG2	Lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain
HES	Amidon hydroxyéthyle
HPSCs	Cellules souches pluripotentes humaines
HTS	<i>Hypothermosol Preservation Solution</i> ou solution de préservation hypothermosol
INS	<i>Insulin Secreting Cell</i> ou cellules sécrétrices d'insuline
IRIP	Protéines inhibitrices de la recristallisation de la glace
JNK	Voie Jun kinase
kDa	Kilodalton
KRBH	<i>Krebs-Ringer bicarbonate HEPES Buffer</i>
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i>
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monométhyle-L-arginine
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
Me <sub>2</sub> SO	Diméthylsulfoxyde
MS/MS	Spectrophotométrie de masse en tandem
NIH3T3	Fibroblasts Cell Line
NMP	N-méthyl pyrrolidone

PAL	Phénylalanine ammonia-lyase
PBS	Tampon phosphate salin
PC12	<i>Neuron-like Pheochromocytoma Cells</i>
PDX	<i>Pancreas Duodenum Homeobox</i>
PP	Cellule sécrétant un polypeptide pancréatique
PVP	Polyvinylpyrrolidone
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RE	Réticulum endoplasmique
REG1 $\alpha$	<i>Regenerating protein I alpha</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ou acide ribonucléique
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	<i>Real Time</i>
SAH	Sérum albumine humaine ou albumine sérique humaine
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SH	Thiol
SOD	Superoxyde dismutase
SulWPE	Extrait de protéines de blé partiellement purifié avec le sulfate d'ammonium
SVF	Sérum de veau fœtal
syAFGP	Glycoprotéine antigel synthétique
SYTOX	Marqueur d'acide nucléique
TaIRI	<i>Triticum aestivum Ice Recrystallization Inhibition Protein</i> ou protéines inhibitrices de la recristallisation de la glace chez <i>Triticum aestivum</i>
TaTIL	<i>Triticum aestivum Temperature Induced Lipocaline</i> ou lipocaline induite par la température chez <i>Triticum aestivum</i>
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TWEEN-20	Polysorbate 20 (agent tensioactif non ionique)
WCOR	<i>Wheat Cold Regulated Protein</i> ou protéines de blé régulées par le froid
UW	<i>University of Wisconsin solution</i>



VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i> ou peptide intestinal vasoactif
WCS	<i>Wheat Cold Specific Protein</i> ou protéines de blé spécifiques au froid
WFTP	<i>Wheat Freezing Tolerance Proteins</i>
WPE	<i>Wheat Protein Extract</i> ou extrait de protéines de blé

## RÉSUMÉ

Le diabète de type I est une maladie auto-immune pouvant s'avérer incontrôlable chez certains patients. L'injection quotidienne d'insuline devient dès lors insuffisante et de nombreux effets adverses peuvent être observés. Dans de tels cas, deux options se présentent aux praticiens, la transplantation d'un pancréas ou la transplantation d'îlots de Langerhans. La première option, réservée à des cas spécifiques qui nécessitent une double greffe (généralement pancréas et rein), consiste en un acte chirurgical invasif et lourd et elle est limitée par la disponibilité de pancréas. La deuxième option, moins invasive, est limitée par la quantité d'îlots fonctionnels et de qualité. Elle requiert plus d'un donneur. L'une des solutions à ce problème est l'amélioration des protocoles de cryoconservation des îlots de Langerhans. Les techniques actuelles ont surtout recours au diméthylsulfoxyde (DMSO), lequel est toxique pour les îlots. D'où l'intérêt de développer de nouvelles méthodes de cryoconservation plus efficaces et moins toxiques. Nous suggérons une nouvelle approche de cryoconservation faisant appel à des protéines végétales et des protéines recombinantes issues du blé. Des cultures primaires d'hépatocytes ont déjà été efficacement cryoconservées avec cette méthode. Une forte viabilité, une bonne adhésion et le maintien des fonctions hépatospécifiques telles que la sécrétion d'albumine et l'induction des isoenzymes de cytochrome P450 furent alors observés. L'hypothèse était que cet extrait de protéines du blé (WPE) et un mélange de protéines recombinantes allaient avoir le potentiel d'améliorer la viabilité de cellules pancréatiques de même que leurs fonctions biologiques après cryoconservation. Le potentiel de ces extraits est lié au mélange de protéines qui ont des fonctions différentes mais complémentaires. La lignée cellulaire INS832/13 provenant d'un insulinome pancréatique de rat induit par rayon X capable de mimer le comportement des cellules et de sécréter de l'insuline a été utilisée pour les premiers essais. Les objectifs principaux étaient le développement d'un milieu de cryoconservation adapté aux particularités de cette lignée avec détermination de la dose optimale de protéines de blé et l'étude de la viabilité des cellules et de leurs fonctions biologiques post décongélation. Une lignée cellulaire ne réagissant pas comme une culture primaire, nous avons dû procéder à de nombreux ajustements afin de développer un milieu de cryoconservation capable d'avoir une toxicité réduite, de conserver une survie maximale des cellules post décongélation mais aussi une adhérence suffisante pour permettre le retour des principales fonctions biologiques associées au métabolisme pancréatique telles que la sécrétion d'insuline et de C-peptide. Plusieurs mélanges ont été testés et optimisés car l'extrait de blé seul, bien que non toxique pour les cellules, ne permettait pas une adhésion suffisante des cellules post décongélation, laquelle est capitale pour le maintien des fonctions biologiques. Le protocole optimisé consiste en une étape de pré-incubation de  $7,5 \times 10^5$  cellules soit avec un mélange de lécithine/glycérol N-méthyl pyrrolidone (NMP) 1% ou un mélange

lécithine/glycérine pendant une heure à 37°C suivi de l'addition de 5 mg de WPE et une cryoconservation immédiate. Nos résultats démontrent que l'ajout de protéines de blé dans le milieu permet de cryoconserver avec efficacité les cellules INS832/13. Ces protéines de blé sont non toxiques, n'ont aucun effet adverse sur la sécrétion d'insuline et permettent une bonne viabilité post-décongélation. La préincubation avec des lipides prévient l'adhésion des protéines de blé à la membrane des cellules et améliore également la viabilité et l'adhésion post décongélation des cellules INS832/13. Les fonctions métaboliques sont maintenues chez les cellules INS832/13 cryoconservées avec le mélange optimisé et l'expression des gènes clé associés au métabolisme pancréatique est comparable entre les cellules fraîches et celles cryoconservées avec notre formulation. La lecithine semble protéger la membrane cytoplasmique contre les dommages induits pendant la cryoconservation tandis que les protéines de blé semblent, quant à elles, améliorer le métabolisme, notamment par une augmentation de la capacité insulino-sécrétoire induite par le glucose. Notre mélange optimisé représente donc une alternative intéressante à la cryoconservation au DMSO et il serait pertinent de tester et d'adapter ce mélange sur des îlots de Langerhans.

Mots clés : cryoconservation, protéines de blé, cellules pancréatiques bêta, viabilité, métabolisme, sécrétion d'insuline

## **CHAPITRE 1**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

#### **INTRODUCTION**

Le diabète est la quatrième cause de décès dans le monde. Il a été estimé en 2012 que 371 millions de personnes à travers le monde seraient touchées par cette maladie (International Diabetes Federation, 2012). Le diabète est une maladie chronique, qui se manifeste par des taux élevés de glucose dans le sang, qui sont eux-mêmes causés par l'incapacité du corps à produire suffisamment d'insuline ou de répondre à celle-ci adéquatement (International Diabetes Federation, 2012). L'insuline est nécessaire pour le corps et elle permet à ce dernier de pouvoir utiliser le glucose en tant que source d'énergie. Malgré l'insulinothérapie, le diabète est susceptible d'entraîner des complications sérieuses telles la perte de vision, une augmentation des risques de maladies cardio-vasculaires, l'accident cérébral vasculaire, l'hypoglycémie, des dommages aux nerfs et aux reins, etc. Il y a deux principaux types de diabète : type I (10% des cas) et type II (90% des cas).

#### **1.1 Le diabète de type I**

Le diabète de type I (diabète juvénile ou diabète mellitus insulino-dépendant, (DID)) est caractérisé par un processus auto-immun de destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et la présence d'auto-anticorps contre les cellules  $\beta$  (Adams, 2003 ; Van den Driessche *et al.*, 2009). Plus précisément, le diabète de type I est caractérisé par une destruction auto-immune des cellules d'îlots sécrétant l'insuline

par l'infiltration et l'interaction coordonnée des cellules T, CD4 et CD8, des lymphocytes, des cellules dendritiques et des macrophages (Jahansouz *et al.*, 2011). Il est généralement diagnostiqué chez les enfants et les jeunes adultes. La destruction des cellules bêta par le système immunitaire inhibent alors la production adéquate d'insuline. Les causes précises sont inconnues mais des facteurs génétiques et environnementaux semblent être impliqués. L'injection d'insuline permet la survie des patients diabétiques mais elle ne suffit malheureusement pas toujours à empêcher l'apparition de complications tardives.

À court terme, les patients peuvent souffrir d'hyperglycémie sévère et d'acidose-cétose diabétique. L'hyperglycémie chronique affaiblit les parois des petits vaisseaux sanguins qui approvisionnent tous les tissus et les organes en oxygène et éléments nutritifs. Les troubles oculaires ne sont pas rares chez les diabétiques. On observe entre autres l'apparition de glaucome ou de cataractes et la perte totale de la vision.

À long terme, le diabète aura des répercussions sur tous les organes et tous les systèmes du corps. Le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux et le système nerveux sont les plus susceptibles d'être touchés. On observe donc, chez les patients souffrant depuis longtemps du diabète, des microangiopathies diabétiques telles la rétinopathie et la néphropathie. On peut également constater des signes de neuropathie diabétique (Massin *et al.*, 2008). En effet, la mauvaise circulation sanguine chez les diabétiques est à l'origine de troubles de la sensibilité tels la perte de sensation (paresthésie), des douleurs et des picotements ressentis aux extrémités supérieures et inférieures. La neuropathie peut également affecter des organes, notamment l'estomac et les intestins. Les patients diabétiques deviennent aussi plus sujets aux infections récurrentes. La maladie réduit considérablement la qualité de vie des patients atteints. L'espérance de vie d'une personne atteinte du diabète de type I peut être raccourcie de 15 ans (International Diabetes Federation, 2012).

## 1.2 Traitements du diabète de type I (insulino-dépendant)

À l'heure actuelle, hormis l'injection quotidienne d'insuline et la surveillance du taux de glucose sanguin, il n'existe pas de traitement curateur de cette maladie. Les traitements conventionnels basés sur la diète, l'injection d'insuline, l'exercice et l'auto-contrôle métabolique ne sont pas suffisants pour prévenir le développement des complications chroniques à court et long terme. La greffe de pancréas est possible mais elle demeure exceptionnelle en raison de la rareté des organes. Elle est donc limitée aux cas extrêmes, i.e., à des patients qui ont également besoin d'une autre greffe, normalement rénale. Il existe cependant une alternative moins invasive que la greffe de pancréas qui consiste en la transplantation d'îlots de Langerhans.

## 1.3 Le diabète de type II

Le diabète mellitus de type II est caractérisé par une déficience relative des cellules bêta due à une compensation diminuée pour la résistance à l'insuline (Balamurugan *et al.*, 2012 ; Bonner-Weir and Weir, 2005). Ce type de diabète est responsable du fort taux de mortalité et de morbidité observé à travers le monde, notamment à cause des complications micro-vasculaires (telles que la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie) et macro-vasculaires (telles que la maladie coronarienne, la maladie périphérique vasculaire et les accidents vasculaires cérébraux) qu'il entraîne (Golden, 2011 ; Jeerakathil *et al.*, 2007 ; Tahergorabi and Khazaei, 2012). C'est une maladie multifactorielle dont le développement implique une prédisposition génétique et plusieurs facteurs environnementaux tels que la mauvaise alimentation, l'absence d'exercices physiques et l'obésité (Li *et al.*, 2011). L'espérance de vie est réduite de cinq ou dix ans.

#### 1.4 Limites des thérapies actuelles

Il n'existe donc aucune cure ni prévention pour le diabète de type I. La thérapie préconisée est l'injection d'insuline plusieurs fois par jour à vie. Les patients doivent surveiller étroitement leur diète et doivent également vérifier leur taux de glucose sanguin plusieurs fois par jour afin d'éviter des complications et des réactions physiologiques conduisant à des épisodes sévères d'hypoglycémie ou d'hyperglycémie, lesquels peuvent être dangereux pour la vie du patient.

Tel que mentionné ci-haut, l'une des alternatives à l'injection d'insuline pour le traitement du diabète de type I chez les patients gravement touchés est la transplantation d'un pancréas entier ou d'îlots de Langerhans. Ces types de transplantation sont les seules options pour les patients sévèrement atteints et elles peuvent éviter la progression des complications (Kabelitz *et al.*, 2008). La transplantation d'un pancréas entier chez l'humain est pratiquée depuis 50 ans et le taux de survie sur cinq ans est de 55%. Alors qu'il existe un risque élevé d'infection avec la transplantation d'un organe, les îlots de Langerhans peuvent, quant à eux, être greffés par infusion sans le fardeau d'une chirurgie majeure (Shapiro *et al.*, 2006). La transplantation nécessite toutefois une très grande quantité d'îlots qui, eux, sont rares. Les îlots doivent ainsi provenir de plusieurs donneurs. L'amélioration des techniques de cryoconservation doit donc être envisagée afin d'établir des banques de cellules, d'augmenter la disponibilité des îlots, d'améliorer les fonctions biologiques telles que la sécrétion d'insuline et de réduire les dommages cellulaires.



### **1.5 La greffe de pancréas**

La greffe de pancréas est une méthode thérapeutique éprouvée utilisée de façon routinière par de nombreux centres de transplantation dans le monde. La greffe ne doit cependant être envisagée que lorsque la maîtrise du diabète pose des problèmes importants. En règle générale, seuls les diabétiques souffrant de graves complications aux reins et devant subir de fréquentes dialyses sont candidats à la greffe. Cette intervention chirurgicale demeure complexe et délicate puisque la compatibilité doit être parfaite. De plus, le pancréas doit provenir d'un être vivant et non d'un cadavre. Cette opération représente une agression chirurgicale lourde nécessitant que l'état général du patient soit en mesure de supporter un tel geste. Le patient doit également demeurer sous immunosuppresseurs à vie.

### **1.6 La transplantation d'îlots de Langerhans**

La transplantation d'îlots est une thérapie de remplacement connue depuis plusieurs années pour les patients atteints d'une forme sévère de diabète mellitus (type I et type II). Elle peut être réalisée à partir d'un donneur cadavérique ou d'un donneur vivant et elle offre la possibilité de remplacer les cellules détruites pour fournir l'insuline nécessaire. Cette technique, beaucoup moins invasive, s'effectue sous anesthésie locale et dure normalement de 10 à 15 minutes. Les îlots (50 à 500  $\mu\text{m}$ ) sont injectés dans le foie via la veine porte où ils seront alors stoppés par leur taille au niveau du parenchyme hépatique et où ils subiront une revascularisation propre se développant dans un délai de 20 jours. En l'absence de complications, le patient peut retourner à son domicile 24 heures après l'intervention. L'objectif principal d'une transplantation d'îlots est l'amélioration de la qualité de vie du patient à moindre risque en normalisant la glycémie et en réduisant le risque des pathologies causées par le diabète. Le choix du foie comme organe récepteur n'est pas étonnant.



De nombreuses études confirment que le foie et le pancréas sont intervertibles dans plusieurs circonstances physiologiques et physiopathologiques (Dominguez-Bendala *et al.*, 2012 ; Rao *et al.*, 1988 ; Rao and Reddy, 1995). En fait, les hépatocytes totalement différenciés et les cellules pancréatiques bêta partagent des mécanismes moléculaires pour la détection du glucose (Kim and Ahn, 2004 ; Nordlie *et al.*, 1999). Au niveau de l'évolution, l'existence d'un hépatopancréas chez plusieurs invertébrés indique que les deux organes ont débuté par un seul (Melton, 1997).

Deux critères relatifs à l'intégrité biologique des cellules sont arbitrairement choisis pour exprimer les résultats de la transplantation : d'une part la persistance d'une sécrétion d'insuline par le greffon (C-Peptide > 1 ng/ml) pendant une durée supérieure à 1 mois; d'autre part, la possibilité de sévrer le patient de l'insulinothérapie pendant une durée supérieure à une semaine.

### **1.7 Histoire de la transplantation d'îlots de Langerhans**

En 1967, Lacy et Kostioanovsky ont établi une méthode pour isoler les îlots de pancréas de rat en utilisant de la collagénase (Lacy and Kostianovsky, 1967). En 1972, Ballinger et Lacy ont démontré une méthode permettant d'isoler des îlots intacts de rongeur lesquels ont conservé des fonctions *in vivo* après transplantation dans un modèle de rat (Ballinger and Lacy, 1972). En 1990, Scharp et ses collaborateurs ont rapporté une insulino-dépendance d'un mois chez des patients diabétiques de type I après transplantation d'îlots pancréatiques (Scharp *et al.*, 1990).

En mai 2000, une équipe d'Edmonton a pratiqué une transplantation d'îlots de Langerhans (intervention connue sous le nom de protocole d'Edmonton) avec un protocole innovant ayant recours à un cocktail d'immunosuppresseurs moins

diabétogènes (moins susceptibles d'induire ou d'aggraver le diabète) chez un malade atteint du diabète de type I. Sept patients avaient rapidement obtenu une indépendance à l'injection d'insuline après la transplantation pendant une moyenne de 11,9 mois (entre 4,4 et 14,9 mois) (Shapiro *et al.*, 2000). Une telle intervention permettait alors dans plusieurs cas de libérer les patients de leurs injections quotidiennes d'insuline mais rarement plus de quelques mois. Certains immunosuppresseurs ont des effets sournois, i.e., qu'ils sont capables d'induire le diabète, c'est notamment le cas de la cyclosporine A (CsA), des corticostéroïdes et du tacrolimus. Le 19 janvier 2005, le docteur James Shapiro pratiquait avec une équipe japonaise la première transplantation à partir d'un donneur vivant, les essais précédents ayant tous été effectués avec des donneurs cadavériques. Le receveur avait alors été indépendant des injections d'insuline pendant plus de trois mois (Matsumoto *et al.*, 2005). La production d'insuline suite à une transplantation d'îlots issus d'un donneur vivant débute quelques minutes seulement après l'injection des îlots dans le foie via la veine porte.

Des études récentes démontrent que la transplantation clinique d'îlots a révélé que 50% des patients sont indépendants de l'insuline pour cinq ans (Dominguez-Bendala *et al.*, 2012). Depuis l'introduction du protocole d'Edmonton, l'indépendance de l'insuline est rencontrée dans plus de 70% des patients un an après la transplantation d'îlots (Shapiro *et al.*, 2006). Cependant, une indépendance sur une longue période, supérieure à 10 ans demeure exceptionnelle, les principales raisons étant des réactions inflammatoires instantanées liées au sang, le rejet aigu et chronique, la récurrence de l'auto-immunité, la toxicité médicamenteuse, le dépôt amyloïde généralisé et les faibles niveaux de prolifération des cellules bêta (Berney *et al.*, 2009 ; Lacotte *et al.*, 2011).

En avril 2013, une étude parue dans la revue *American Journal of Transplantation* témoigne qu'une patiente atteinte de diabète de type I qui avait reçu

une transplantation d'îlots de Langerhans a réussi à vivre 13 ans sans injection d'insuline. Celle-ci n'est pas décédée du diabète mais d'une hémorragie cérébrale (Muller *et al.*, 2013). Lors de tests effectués post-mortem afin d'évaluer le métabolisme des îlots transplantés 13 ans auparavant, il fut constaté que ces derniers bien qu'implantés dans le foie avaient conservé d'excellentes fonctions métaboliques. Avec les résultats obtenus ces dernières années, l'intérêt d'une telle greffe a été relancé et plusieurs études ont été conduites afin d'améliorer le succès des transplantations d'îlots et continueront d'être effectuées dans le futur (Sakata *et al.*, 2012). De fait, on assiste à une augmentation des programmes cliniques de greffe d'îlots de par le monde depuis le début des années 90.

### **1.8 Avantages et inconvénients de la transplantation d'îlots de Langerhans**

Puisque la transplantation d'îlots est une technique beaucoup moins invasive que la greffe de pancréas, elle est susceptible d'être répétée chez un même patient, si le besoin se présentait. C'est ce caractère moins invasif qui justifie les efforts maintenant redoublés afin de faire progresser cette approche thérapeutique.

Il faut également mentionner qu'afin de conserver la masse transplantée de cellules bêta, les receveurs d'une telle transplantation doivent prendre des immunosuppresseurs, lesquels sont reconnus, sous les régimes actuels, comme étant toxiques pour les cellules bêta. Cette limitation a ultimement conduit à une fonction très limitée sur le long terme des îlots transplantés alors que la communauté médicale cherche à fournir une cure durable pour les patients (Balamurugan *et al.*, 2012).

De plus, les résultats obtenus avec l'injection d'îlots provenant d'un donneur cadavérique sont encore mitigés. Les îlots prélevés chez des patients en état de mort cérébrale sont souvent sévèrement endommagés par le froid durant le transport alors

que le pancréas est lui-même détérioré par les toxines circulant dans le sang après la mort cérébrale.

La médecine faisant face à un manque flagrant de donneurs, les délais d'intervention pour ce type d'opération peuvent être de plusieurs années. Il faut en effet un minimum de 10 000 îlots-équivalents/kg pour l'obtention de l'insulino-indépendance sur un terrain auto-immun (Shapiro *et al.*, 2000). Or, une telle quantité d'îlots est rarement obtenue par un seul pancréas et nécessite le plus souvent de combiner les îlots de deux glandes, voire plus. La réussite de la greffe est de plus directement dépendante de la qualité des îlots des donneurs. Ces obstacles peuvent être contournés par le développement de meilleures techniques de cryoconservation.

Bien que la transplantation d'îlots de Langerhans représente à l'heure actuelle l'une des modalités thérapeutiques les plus prometteuses pour le traitement du diabète de type I, de nombreuses améliorations doivent lui être apportées (Dominguez-Bendala *et al.*, 2012 ; Weir and Bonner-Weir, 1997). L'un des principaux défis actuels est de fournir un nombre élevé d'îlots de qualité qui conserveront leur intégrité biologique afin de pallier aux contraintes mentionnées précédemment. Pour ce faire, différentes techniques de cryoconservation ont été mises au point. L'amélioration de ces techniques permettra également de coupler les îlots de plusieurs donneurs, d'effectuer des tests de stérilité, de viabilité, d'histocompatibilité et de les transporter vers des sites éloignés (Rajotte *et al.*, 1990 ; Rich *et al.*, 1994).

## **1.9 Le pancréas**

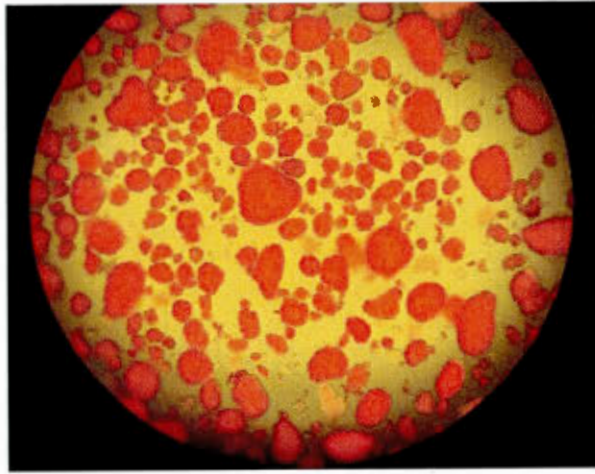
### **1.9.1 Histologie du pancréas**

Le pancréas est une volumineuse glande amphicrine, i.e., à tissu exocrine et endocrine. La portion glandulaire et exocrine est une glande alvéolaire et séreuse à l'intérieur de laquelle sont dispersées les formations glandulaires endocrines richement vascularisées nommées îlots de Langerhans.

### **1.9.2 Histologie des îlots de Langerhans**

Les îlots de Langerhans (Figure 1.1) naissent de la prolifération cellulaire des extrémités des tubes pancréatiques primitifs issus des bourgeons pancréatiques ventraux et dorsaux, proliférations endodermiques de la portion caudale de l'intestin antérieur. Les éléments conjonctivo-vasculaires dérivent du mésenchyme avoisinant. Trois grands types cellulaires composent les îlots de Langerhans : les cellules alpha responsables de la sécrétion du glucagon (24%), les cellules  $\beta$  qui sécrètent l'insuline (66% à 74%) et les cellules D qui sécrètent la somatostatine (4%).





**Figure 1.1 :** Ilots de Langerhans, image tirée de McCall et Shapiro (2012)

### **Les cellules alpha**

Ce sont des cellules à l'aspect granuleux responsables de la sécrétion d'une hormone hyperglycémisante, le glucagon. Elles ont un diamètre de 15  $\mu\text{m}$  au noyau nucléolé. Ce sont des cellules riches en vitamine C, enzymes, glycoprotéines sans fonction thiol (-SH) et en tryptophane. Elles sont généralement situées en périphérie des îlots.

### **Les cellules bêta**

Ce sont de larges cellules à l'aspect microgranuleux qui sécrètent l'insuline, qui est un facteur hypoglycémiant.

## Les cellules D

Ces cellules ne constituent que 4% des cellules pancréatiques. Elles comportent de fines granulations et elles sécrètent la somatostatine.

Il existe d'autres types cellulaires : les cellules PP (cellules sécrétant un polypeptide pancréatique) (2%); les cellules sécrétant le peptide intestinal vasoactif (VIP) et les cellules antérochromaffines sécrétant des peptides. Parmi ces différents types cellulaires, les cellules bêta jouent un rôle capital dans la régulation de la glycémie et c'est le dérèglement de cet équilibre qui est responsable du diabète de type I.

### 1.9.3 Production et sécrétion de l'insuline par la cellule $\beta$ pancréatique

L'insuline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Son principal rôle est de réduire le taux de sucre dans le sang, elle est donc hypoglycémiante. Elle sert également à faire pénétrer dans les cellules le sucre qui servira de combustible afin de produire de l'énergie. Le glucose est, quant à lui, un agent stimulant puissant de la biosynthèse de l'insuline. La majeure partie de son action passe par la stimulation de l'expression du gène de l'insuline qui résulte à la fois de son effet positif vis-à-vis de l'activité de transcription et de la stabilisation des ARNm (Tiedge *et al.*, 1997). Le glucose pénètre dans la cellule  $\beta$  par l'intermédiaire du transporteur GLUT2 chez les rongeurs et de GLUT1 chez l'humain. Il est ensuite phosphorylé en glucose-6-phosphate par la glucokinase. Une fois phosphorylé, le glucose est principalement utilisé par la voie de la glycolyse et de la respiration oxydative.

#### 1.9.4 Le C-peptide et l'insuline

Le C-peptide est un polypeptide de connexion (C) constitué d'une chaîne unique de 31 acides aminés (position 33-63) et incorporé dans la pro-insuline. Sa masse moléculaire est d'environ 3 kilodalton (kDa). Au cours de la biosynthèse de l'insuline, le C-peptide, généré lors du clivage protéolytique de son précurseur la proinsuline, est co-sécrété avec l'insuline et stocké dans les granules de sécrétion de l'appareil de Golgi des cellules  $\beta$  pancréatiques. La proinsuline résulte elle-même du clivage de la pré-proinsuline. Le C-peptide joue un rôle important dans la connexion structurelle des chaînes A et B de l'insuline et la formation de deux ponts disulfures dans la molécule proinsuline. Il facilite la synthèse de l'insuline, son pliage, son transport dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules  $\beta$ . Le C-peptide et l'insuline sont sécrétés en quantité équimolaire et libérés dans le sang de la veine porte. La demi-vie du C-peptide est plus longue (environ 35 minutes) que celle de l'insuline (qui est éliminée à 50% par le foie) en raison de sa faible extraction. Les concentrations de C-peptide persistent dans les veines périphériques et sont moins sujettes aux variations que les concentrations d'insuline. En raison de la forte prévalence des anticorps anti-insuline endogènes, les concentrations de C-peptide reflètent mieux la sécrétion d'insuline pancréatique chez les patients insulino-traités que l'insuline elle-même. Cela fait donc du C-peptide un marqueur de la sécrétion d'insuline (Said *et al.*, 2010).



### 1.9.5 Gènes et protéines associés au métabolisme et fonctions des cellules $\beta$

#### 1.9.5.1 Les perméases du glucose

Les perméases du glucose sont des protéines responsables du transport membranaire du glucose (Khan and Pessin, 2002).

- **GLUT1** : La protéine GLUT1 facilite le transport du glucose au travers des membranes cellulaires des cellules de mammifères et est responsable pour la fixation basale du glucose.
- **GLUT2** : La protéine GLUT2 est un transporteur de glucose à faible affinité. Il représente le senseur de glucose des cellules  $\beta$ .
- **GLUT3** : La protéine GLUT3 est un transporteur de glucose à haute affinité.

#### 1.9.5.2 Le gène de l'insuline humaine (*Ins*)

La préproinsuline est le principal produit de traduction du gène de l'insuline (*Ins*) et est un précurseur qui est transformé en proinsuline, laquelle subit un clivage protéolytique pour produire l'insuline et le C-peptide. Ce gène est presque exclusivement exprimé dans les cellules pancréatiques  $\beta$  (Bugos *et al.*, 1998).

#### 1.9.5.3 Le facteur de transcription Pdx1 (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*)

En réponse à l'insuline, il y aura augmentation de l'expression du gène codant pour le facteur de transcription Pdx1. Ce facteur est important pour la survie et la différenciation des cellules  $\beta$  (Prentki and Nolan, 2006) et agit principalement en

régulant à la hausse la transcription de plusieurs gènes spécifiques des cellules  $\beta$ , incluant *Ins* et *Glut2* (Demel and De Kruffy, 1976).

#### **1.9.5.4 Le gène Reg1 $\alpha$ (Regenerating Islet-Derived 1 Alpha)**

Le gène régénérateur Reg1 $\alpha$  code pour une protéine associée avec la régénération des îlots pancréatiques (Grankvist et al., 1981).

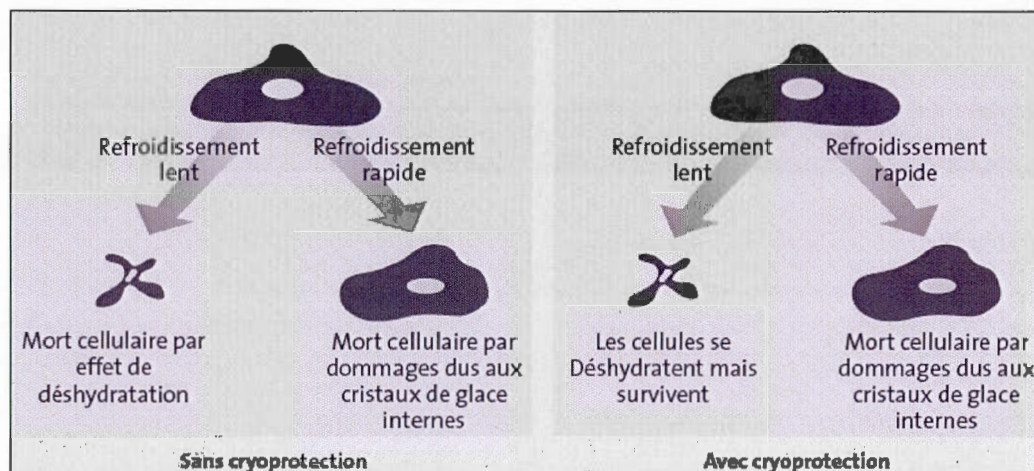
### **1.10 La cryoconservation**

Par définition, la cryoconservation permet le maintien de tissus biologiques dans un état de vie et d'animation suspendus à des températures cryogéniques. À la température de  $-196^{\circ}\text{C}$ , température de l'azote liquide, toutes les réactions chimiques, les processus biologiques et les interactions physiques intra et extracellulaires sont suspendus. En théorie, une cellule cryoconservée peut être conservée indéfiniment (Bakhach *et al.*, 2007).

#### **1.10.1 Bases fondamentales de la cryoconservation**

Pour un groupe cellulaire uniforme, la cryoconservation permet de nos jours de suspendre les processus chimiques tout en préservant l'architecture cellulaire tridimensionnelle indéfiniment. Il est également primordial que les agents cryoprotecteurs utilisés soient adaptés et spécifiques aux types cellulaires ou aux tissus concernés (Levin *et al.*, 1976). La cryoconservation de matériel biologique est délicate. La vitesse de refroidissement doit être suffisamment lente pour empêcher la

formation de glace intracellulaire mais assez rapide pour éviter les effets causés par la déshydratation (Figure 1.2). De cette façon, les cellules peuvent survivre aux processus de congélation et de décongélation. Les agents cryoprotecteurs ont peu d'effets sur les dommages causés par une congélation trop rapide (formation de cristaux de glace intracellulaire), mais ils peuvent prévenir ou diminuer généralement les dommages dus à la congélation lente (déshydratation et rétrécissement) (Mazur, 1984).



**Figure 1.2 :** Effets cellulaires avec ou sans cryoconservateurs, figure tirée du guide général de cryoconservation de culture de cellules animales (Ryan, 2004)

Afin de procéder à une conservation cellulaire sur une longue période en présence de cryoprotecteurs, il faut atteindre des températures inférieures à  $-130^{\circ}\text{C}$ . Il n'est pas difficile d'imaginer les risques que peuvent subir les cellules lors de la chute des températures de  $+37$  à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ces risques sont principalement liés à une perte d'environ 95% du volume d'eau intracellulaire et à une augmentation considérable du taux de concentration des électrolytes aussi bien dans le milieu intra qu'extracellulaire (Rubinsky *et al.*, 1991). De plus, il y a la possibilité de formation

de cristaux de glace soit dans l'espace intercellulaire pouvant déformer et comprimer les cellules soit à l'intérieur même de celles-ci détruisant les structures intracellulaires (Diller, 1990 ; Rubinsky *et al.*, 1991).

### **1.10.2 Substances cryoprotectrices courantes**

Il existe deux catégories de cryoprotecteurs, diffusibles ou non diffusibles. Ils ont des modes d'action et des poids moléculaires différents.

#### **1<sup>ère</sup> catégorie :**

Les cryoprotecteurs diffusibles ou à action intracellulaire sont de poids moléculaires inférieurs à 400 kDa et ils traversent la membrane cellulaire. Les plus utilisés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO), le glycérol et le 1,2-propanediol. Ces derniers, tout comme l'eau, ne traversent pas les membranes immédiatement. Leur diffusion à l'intérieur et à l'extérieur des cellules est régie par des paramètres de diffusion propres au cryoprotecteur et au type cellulaire. En se substituant à une partie de l'eau intracellulaire, ils permettent une déshydratation partielle des cellules en plus de limiter la formation de cristaux de glace intracellulaire (Grondin *et al.*, 2008 ; Hey and MacFarlane, 1998 ; Palasz and Mapletoft, 1996). La méthode traditionnelle de cryoconservation se fait avec du DMSO. Cependant, en raison de la toxicité du DMSO envers les cellules, plusieurs équipes se sont penchées sur d'autres techniques de cryoconservation.

#### **2<sup>e</sup> catégorie :**

Les cryoprotecteurs non diffusibles ou à action extracellulaire sont de poids moléculaires élevés et ils ne traversent pas la membrane cellulaire. On en compte plusieurs comme la polyvinylpyrrolidone (PVP), l'amidon hydroxyéthyle, le sérum de veau fœtal (SVF), l'albumine sérique bovine (BSA), le ficoll (polymère de

saccharose) et certains autres polymères. Ils ont un rôle osmotique très important, notamment lors du réchauffement car ils favorisent la sortie des cryoprotecteurs perméables. En maintenant une osmolarité élevée dans le milieu extracellulaire, ils évitent une entrée massive d'eau dans les cellules lors de la décongélation (Grondin *et al.*, 2008 ; Meryman, 1966). Ils protègent pendant la congélation et décongélation en diminuant la taille des cristaux de glace et en leur donnant des formes moins dommageables. Ce dernier type de cryoprotecteur est généralement utilisé conjointement avec les cryoprotecteurs diffusants afin d'améliorer le potentiel de ces derniers.

### **1.10.3 Méthodes de cryopréservation testées sur des îlots de Langerhans**

Le processus de congélation et de décongélation est particulièrement stressant pour les îlots pancréatiques. Des études (El-Shewy *et al.*, 2004) ont émis l'hypothèse que les composés de faible poids moléculaire tels que le DMSO et le glycérol pénètrent la cellule et interagissent de manière hydrophobe avec les protéines intracellulaires, perturbant ainsi l'architecture des cellules cryoconservées et diminuant les fonctions et l'intégrité des îlots (Stiegler *et al.*, 2006). En effet, les méthodes existantes de cryoconservation où on utilise le DMSO sont connues pour ne pas être optimales car elles permettent d'obtenir environ 50% de survie (Taylor and Baicu, 2009). Rajotte et son équipe ont démontré en 2001, qu'une cryoconservation associant soit le DMSO avec la solution UW (*University of Wisconsin*) (acide lactobionique 35,83 g/L, phosphate de potassium monobasique 3,4 g/L, sulfate de magnésium heptahydraté 1,23 g/L, raffinose pentahydraté 17,83 g/L, adénosine 1,34 g/L, allopurinol 0,136 g/L, glutathion total 0,922 g/L, hydroxyde de potassium 5,61 g/L, acide hydrochlorydrique/hydroxyde de sodium ajusté au pH 7,4, eau), soit le DMSO avec l'hypothermosol ou HTS (*Hypothermosol Preservation Solution*) permettait de récupérer un maximum d'îlots (respectivement  $79.8 \pm 1.9\%$  et  $82.5 \pm$



1.5%) (Lakey *et al.*, 2001). Ils ont également démontré qu'une cryoconservation sans DMSO permettait une récupération de moins de 15% d'îlots (Lakey *et al.*, 2001).

D'autres équipes se sont penchées sur diverses méthodes de conservation des îlots qui sont décrites ci-dessous :

- Cryoconservation combinant 5% de DMSO en tant que cryoconservateur intracellulaire avec de l'amidon hydroxyéthyle (HES), un colloïde synthétique exogène (Maruyama and Kashiwabara, 2004). Le taux de recouvrement après décongélation a été de 71% et les fonctions des îlots furent bien maintenues.
- Cryoconservation et maintien en culture post décongélation des îlots avec de la curcumine (Kanitkar and Bhonde, 2008). L'ajout de 10  $\mu$ M de curcumine au milieu de cryoconservation a permis l'obtention d'une viabilité de  $85,13 \pm 4,7\%$ . Les îlots cryoconservés en présence de curcumine et incubés avec de la curcumine pendant la période suivant la décongélation ont montré un pourcentage encore plus élevé de récupération d'îlots intacts ( $87,81 \pm 4,13\%$ ). Les îlots cryoconservés en présence de curcumine ont montré une meilleure morphologie et intégrité que les îlots cryoconservés avec les milieux de cryoconservation habituels au DMSO qui occasionnent chez les îlots des morphologies distordues.
- Cryoconservation d'îlots avec un analogue de glycoprotéine antigel synthétique (syAFGP), trouvé dans le sérum du sang des poissons Notothenioidei (poissons-antarctiques) ou de la morue Arctique *Boreogadus saida* (Harding *et al.*, 2003 ; Matsumoto *et al.*, 2006). Le taux de récupération d'îlots cryoconservés avec la syAFGP et DMSO atteint  $85,0 \pm 6,2\%$  tandis qu'il n'est que de  $63,3 \pm 14,2\%$  avec le DMSO seul. La cryoconservation à l'aide de cette glycoprotéine synthétique a permis une bonne sécrétion d'insuline, comparable à l'index de stimulation

statique de  $3.86 \pm 0.43$  alors que le taux de sécrétion sans la protéine était de  $2.98 \pm 0.22$ . À une concentration de 500 µg/ml de syAFGP, il y avait une forte atténuation de la formation et de la croissance de cristaux de glace et les cristaux formés ne causèrent pas de blessures de cryoconservation.

Malgré les avantages à utiliser la cryoconservation sur des tissus, il n'en demeure pas moins que ces techniques doivent être améliorées pour limiter les différents stress qu'elles peuvent engendrer, notamment lors de la congélation-décongélation des cellules ou îlots.

#### **1.10.4 Toxicité et limites des méthodes actuelles de cryoconservation des îlots de Langherans**

Les techniques de préservation actuelles sont essentiellement basées sur le DMSO et cela entraîne des pertes considérables d'îlots et de leurs fonctions après décongélation (Lakey *et al.*, 1994 ; Rajotte *et al.*, 1990). Le DMSO est toxique pour les îlots et il inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose (McKay and Karow, 1983a). Il a également été démontré que lors de transplantation d'organes ou de tissus chez l'humain, le DMSO résiduel peut avoir des effets secondaires chez le receveur. C'est pourquoi, d'autres approches et méthodes de cryoconservation devront être développées.

## **1.11 Vers de nouveaux cryoprotecteurs : les protéines de blé d'hiver**

### **1.11.1 Le blé d'hiver**

Le froid est un facteur abiotique limitant la distribution des espèces végétales sauvages. On peut observer une baisse de productivité des cultures lorsque celles-ci sont sujettes à des gelées hâtives à l'automne ou à des températures anormalement basses en hiver (Grondin, 2008). Afin de s'adapter à de telles fluctuations transitoires et aux différentes saisons, les plantes doivent pouvoir les appréhender en ajustant leur métabolisme (Fowler *et al.*, 1999 ; Grondin, 2008 ; Huner *et al.*, 1998 ; Vartapetian and Jackson, 1997). L'exposition des plantes à de basses températures entraîne des changements morphologiques, biochimiques et physiologiques. Ces modifications sont souvent corrélées avec le développement d'une tolérance au froid chez les plantes et leur survie à l'hiver (Grondin, 2008). Chez les plantes subissant un stress de température, il est fréquent d'observer des changements au niveau des membranes, des modifications des osmoprotecteurs, des sucres, des antioxydants et des protéines (Breton *et al.*, 2000 ; Grondin, 2008). On sait que lorsque les plantes sont exposées à des stress abiotiques tels que les basses températures, la fluidité de leurs membranes est perturbée (Grondin, 2008 ; Nishida and Murata, 1996).

Les basses températures induisent d'importants changements dans la composition en lipides des membranes. En effet, les plantes modifient les types de lipides ainsi que leur degré de saturation afin de préserver la fluidité membranaire et d'empêcher les dommages membranaires induits par le gel (Nishida and Murata, 1996 ; Uemura and Steponkus, 1994). Les stress thermiques entraînent une augmentation de la concentration des corps dissous intracellulaires (Grondin, 2008) et une synthèse d'osmoprotecteurs et de sucres pour conserver leur osmolarité. Les osmoprotecteurs sont des composés solubles, neutres au pH physiologique et non



toxiques à fortes concentrations (Grondin, 2008). Ils sont produits par tous les organismes (McNeil *et al.*, 1999 ; Yancey *et al.*, 1982).

Le phénomène d'acclimatation au froid provoquerait également une augmentation du contenu en sucres chez plusieurs espèces (Chen and Li, 1982 ; Grondin, 2008 ; Perras and Sarhan, 1984 ; Siminovitch, 1982 ; Trunova, 1982). Il fut démontré par Perras et Sarhan que les contenus en sucres solubles, sucres réducteurs et adénosine triphosphate (ATP) étaient plus élevés chez le blé d'hiver (tolérance plus élevée au gel) que chez le blé de printemps pendant l'acclimatation au froid (Perras and Sarhan, 1984). Certains de ces composés sont supposés stabiliser les membranes et les protéines durant l'acclimatation au froid (Guy, 1990). Le blé d'hiver, avec une accumulation de sucres et d'ATP, a un statut énergétique plus élevé que le blé de printemps. Cela pourrait permettre la synthèse de substances protectrices de nature protéique, glycoprotéique ou lipidique qui auraient pour effet d'augmenter la tolérance des membranes au gel. L'accroissement de la concentration en sucres contribue avec d'autres composés à l'augmentation de l'osmolarité intracellulaire, ce qui conduit à l'abaissement du point de congélation et à la protection de la cellule végétale contre le gel intracellulaire (Cadieux *et al.*, 1988 ; Grondin, 2008). Les polyols tels que le mannitol, le D-onnitol, l'inositol et le sorbitol sont des alcools dérivés de sucres étroitement liés à ces derniers et capables d'imiter la structure de l'eau en maintenant une sphère artificielle d'hydratation autour des macromolécules (Bartels and Nelson, 1994). Ils constituent donc une autre classe de composés avec activités osmoprotectrices (Grondin, 2008). Lors de stress environnementaux, les plantes augmentent la synthèse d'antioxydants tels que le glutathion (GSH), la vitamine C (ascorbate), la vitamine E (tocophérol) ainsi que des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR), l'ascorbate peroxydase (APX) et la catalase (Grondin, 2008 ; Noctor and Foyer, 1998). Une augmentation marquée du contenu en protéines a été constatée pendant l'acclimatation au froid chez de nombreuses espèces

ayant la capacité de développer une tolérance au gel (Grondin, 2008 ; Guy, 1990 ; Hughes and Dunn, 1996 ; Thomashow, 1990). Ces protéines s'accumulent dans plusieurs cas à des niveaux plus élevés chez les variétés tolérantes au gel, ce qui suggère qu'elles pourraient justement être impliquées dans le développement de la tolérance au gel (Grondin, 2008).

Les plantes, limitées par le facteur mobilité, doivent redoubler d'efforts et d'ingéniosité afin de s'adapter aux conditions abiotiques imposées (température et hygrométrie) par leur environnement immédiat (Grondin, 2008). Le froid entraîne généralement une inhibition du développement des plantes, que ce soit pour la germination, la floraison ou la formation des fruits. Certaines plantes sont toutefois parvenues à développer des mécanismes leur permettant d'obtenir une tolérance plus élevée au froid. L'acclimatation au froid se fait en deux étapes. On observe tout d'abord une adaptation des plantes aux basses températures et ensuite une acquisition de la tolérance au gel. Une telle acclimatation entraîne de multiples modifications physiologiques et biochimiques, lesquelles résultent en des changements dans l'expression de certains gènes.

### **1.11.2 Les protéines de tolérance au gel**

Bien que le DMSO offre une bonne protection lors de la cryoconservation, il comporte toutefois des limitations, notamment sa toxicité. Il existe plusieurs cryoprotecteurs naturels, dont des protéines de tolérance au gel (FTP) chez certaines plantes, insectes et poissons qui peuvent être utiles lors de la cryoconservation. On note, entre autres, les protéines issues du blé d'hiver telles que les WFTPs (*Wheat Freezing Tolerance Proteins*), les déhydrines (DHN), les lipocalines et les IRIPs (*Ice*

*Recrystallization Inhibition Proteins*). Plusieurs protéines associées à la résistance au gel ont été découvertes dans le laboratoire du Dr. Fathey Sarhan.

Lors de travaux antérieurs dirigés par les laboratoires du Dr. Sarhan et du Dr. Averill, des extraits de protéines de blé, les WPEs (*Wheat Protein Extracts*), dont un extrait partiellement purifié avec du sulfate d'ammonium ou de l'acétone (SulWPE ou AcWPE) et des protéines recombinantes associées à la tolérance au gel chez le blé (WCS120, WSC19, WCOR410, *TaTIL* et *TaIRI-2*) ont déjà été utilisés avec succès pour cryoconserver des hépatocytes (Grondin, 2008). La viabilité des hépatocytes était d'ailleurs excellente avec 20 mg d'extrait partiellement purifié au sulfate d'ammonium (SulWPE à 60% et 80% de saturation donne une viabilité respective de 82,64% et de 84,34%).

La congélation avec les extraits précipités à l'acétone, à raison de 20 ou 40 mg d'AcWPE, avait donné des viabilités de l'ordre de 77.32 et 84.95 %, respectivement (Grondin, 2008) contre 66,93% avec le DMSO. Les protéines partiellement purifiées ont également permis un meilleur maintien de l'adhésion et des fonctions hépatospécifiques (l'adhésion 3 heures post décongélation des cellules cryoconservées avec AcWPE et SulWPE était de 76 % contre 65 % avec DMSO et de 70% pour les AcWPE et SulWPE 24 heures plus tard contre 50% pour le DMSO) (Grondin, 2008). Dans un premier temps, ces extraits (bruts, purifiés ou protéines recombinantes) ont été utilisés pour cryoconserver une lignée cellulaire pancréatique, les INS832/13. Une fois le protocole optimisé avec la lignée cellulaire, ces mêmes extraits pourront être utilisés afin de cryoconserver des îlots de Langerhans. Les mécanismes impliqués dans ces effets protecteurs ne sont pas entièrement élucidés et devront également faire l'objet d'investigations futures.

### 1.11.3 Les protéines inhibitrices de la recristallisation de la glace

Les protéines antigel AFP (*Anti-Freeze Proteins*) sont un groupe de protéines structurellement hétérogènes. Elles sont capables de modifier la structure des cristaux de glace (Raymond and DeVries, 1977) et d'inhiber la recristallisation de la glace (Knight *et al.*, 1988). Cette inhibition est la capacité des AFPs à limiter la croissance des cristaux de glace à des températures inférieures à zéro (Knight *et al.*, 1984), d'où l'appellation protéines inhibitrices de la recristallisation de la glace (IRIP). Des protéines IRIPs ont été retrouvées dans une grande variété d'organismes qui doivent se protéger contre des dommages causés par le gel, y compris plusieurs plantes, insectes, poissons, mycètes et bactéries (Crevel *et al.*, 2002 ; Doucet *et al.*, 2002). Chez le blé, nous avons entre autres deux protéines *TaIRI-1* et *TaIRI-2* codées par les gènes *TaIRI-1* et *TaIRI-2* (*Triticum aestivum* Ice Recrystallization Inhibition) respectivement qui sont activés pendant l'acclimatation au froid chez les espèces tolérantes. *TaIRI-2* est un gène régulé à la hausse pendant l'acclimatation au froid chez les céréales tolérantes au gel (Grondin *et al.*, 2009b ; Sidebottom *et al.*, 2000 ; Tremblay *et al.*, 2005). Son produit est une protéine apoplastique qui a une fonction extracellulaire chez le blé en inhibant la croissance des cristaux de glace (Tremblay *et al.*, 2005). Il a été émis que la capacité de la protéine *TaIRI-2* à inhiber la croissance de cristaux de glace au niveau extracellulaire pourrait aussi diminuer la formation de glace au niveau intracellulaire, ce qui pourrait également contribuer à la survie et à la protection de la membrane plasmatique pendant la cryoconservation d'hépatocytes.

### 1.11.4 Les déhydrines

Les déhydrines sont les protéines de stress les plus abondantes et elles sont induites dans les plantes lors de stress tels que la sécheresse, le gel et la salinité. Parmi les déhydrines retrouvées dans le blé, nous avons WCS120 et WCOR410. La

protéine WCS120 étant très hydrophile, permettrait de fournir un microenvironnement propice aux protéines et d'ainsi réduire la dénaturation résultant de la perte de molécules d'eau (Jaenicke, 1991). La teneur élevée de WCS120 dans le noyau cellulaire indique que cette protéine peut être importante pour la protection de la machinerie transcriptionnelle. Elle pourrait enrober les protéines cellulaires essentielles et les protéger contre les changements conformationnels ou contre l'agglomération pendant la congélation ou la déshydratation (Grondin *et al.*, 2009b ; Houde *et al.*, 1995). L'effet cryoprotecteur de ces protéines pourrait être lié à leur accumulation au niveau des tissus vasculaires pendant l'acclimatation au froid. Leur présence dans ces tissus pourrait jouer un rôle important dans la survie de cette région critique requise pour la reprise de croissance (Houde *et al.*, 1995).

WCOR410, pour sa part, agirait comme protéine stabilisatrice de la membrane plasmique (Danyluk *et al.*, 1998). Ses propriétés, son abondance et sa localisation suggèrent une implication dans la cryoprotection de la membrane plasmique durant la congélation (Danyluk *et al.*, 1998). Il fut également proposé que WCOR410 joue un rôle en empêchant la déstabilisation de la membrane plasmique qui se produit pendant les conditions de déshydratation liées à la congélation, et pourrait être un facteur déterminant pour la résistance des cellules à la congélation. Les protéines telles que WCOR410 possèdent un contenu élevé en acides aminés acides, basiques et hydroxylés, lesquels peuvent interagir avec des lipides membranaires, tels que différents phospholipides, des cébrosides et des stérols. Si une molécule de WCOR410 était capable de se lier à plusieurs espèces de lipides en même temps, ceci pourrait servir de base pour empêcher la désorganisation lipidique qui se produit pendant la déshydratation. Les déhydrines acides comme WCOR410 pourraient avoir une implication dans la conservation de l'eau ou directement remplacer l'eau pour la solvatisation de la membrane (Danyluk *et al.*, 1998).



### 1.11.5 Les lipocalines

Un autre exemple de protéine de tolérance au gel présente chez *Triticum aestivum* est TaTIL (*Triticum aestivum Temperature Induced Lipocaline*). C'est une lipocaline ancrée à la membrane qui s'accumule dans les tissus de blé lors d'un stress au froid (Frenette Charron *et al.*, 2002). Le niveau d'expression de TaTIL est corrélé avec la capacité des plantes à développer une tolérance au gel. Les contraintes thermiques sont connues pour induire des blessures aux membranes. Les lipocalines ancrées à la membrane (Blc, ApoD, Lazarillo et possiblement TaTIL et AtTIL) semblent toutes être exprimées en réponse aux conditions qui entraînent des stress aux membranes, ce qui suggère un rôle biologique dans la biogénèse des membranes et la réparation dans des conditions de stress graves (Frenette Charron *et al.*, 2002). Les lipocalines sont des petites protéines de structure tertiaire simple possédant la capacité de lier de petites molécules généralement hydrophobes (Levesque-Tremblay *et al.*, 2009). Ces protéines ont la particularité de lier des ligands et elles présentent des similarités dans leur structure primaire, secondaire et tertiaire ainsi que dans leur mode d'action (Flower, 1996 ; Pervaiz and Brew, 1985). Les lipocalines sont les enzymes principales du cycle des xanthophylles qui sont responsables de la protection contre les dommages photo-oxydants (Bugos *et al.*, 1998). Charron *et al.*, 2002 ont démontré que le niveau d'ARNm de TaTIL augmente lors de l'exposition à de hautes et basses températures. Or, il est connu que le niveau d'expression de TaTIL est corrélé avec la capacité des plantes à développer une tolérance au gel. Elle pourrait également être impliquée dans le transport de stérol à la membrane en réponse au stress (Demel and De Kruffy, 1976).

### **1.11.6 Protéines abondantes tardives de l'embryogénèse du groupe 3 ou « *Late Embryogenesis Abundant Protein, Group 3* »**

Une autre classe de protéines présentes chez le blé ainsi que chez plusieurs plantes et animaux sont les protéines LEA3-like qui peuvent être classifiées en tant que petites (groupes LEA3-L1 et LEA3-L2) et grandes protéines (groupe LEA3-L3). Ces protéines possèdent un peptide signal pour les chloroplastes ou les mitochondries. Les protéines LEA3-like sont ainsi prévues pour être transloquées dans les organelles. Cela suppose donc que leurs propriétés et fonctions aient pu évoluer pour fonctionner dans un environnement spécifique aux organelles. En conditions de stress, il est important de protéger les chloroplastes et les mitochondries afin de maintenir la production énergétique cellulaire. Bien que l'on ait observé une activité cryoprotective de WCS19 (LEA3-L2) chez le blé, son mode d'action n'est pas encore complètement élucidé. Nous possédons peu d'information sur les fonctions de WCS19, mais celle-ci semblerait jouer un rôle dans l'amélioration de la tolérance à la congélation (Grondin *et al.*, 2009b ; N'Dong *et al.*, 2002). Elle pourrait interagir avec des lipides ou des protéines spécifiques dans la membrane ou le stroma des chloroplastes (N'Dong *et al.*, 2002).

## **1.12 Hypothèse de travail et objectifs**

### *Hypothèse*

- 1) Des extraits de protéines induites par le froid chez le blé d'hiver auraient le potentiel d'améliorer la viabilité et les fonctions biologiques des cellules INS832/13 cryoconservées.



### *Objectif général*

L'objectif général consiste en la mise au point d'un milieu de congélation d'une lignée cellulaire pancréatique (INS832/13) en ayant recours à une nouvelle technologie de cryoconservation utilisant des protéines végétales issues du blé (WPE) et en l'étude des mécanismes des effets cryoprotecteurs de ces protéines de blé. Ce protocole a déjà été appliqué avec succès pour la cryoconservation d'hépatocytes de rats et nous croyons que cette technique nous permettra de cryoconserver efficacement les cellules INS832/13 en augmentant la viabilité post décongélation de celles-ci et la récupération de leurs fonctions métaboliques de base (sécrétion C-peptide, sécrétion d'insuline, etc.). Les avantages potentiels de cette technique sont : l'efficacité, la capacité d'entreposage à long terme, la récupération d'une grande quantité de cellules saines avec le maintien de leur intégrité biologique et de leurs activités métaboliques et l'absence de toxicité comparativement au DMSO.

### Objectifs spécifiques

**Objectif 1 :** Développement d'un médium optimal de cryoconservation à partir d'un extrait de protéines de blé.

**Objectif 2 :** Détermination de ses effets sur la viabilité et l'intégrité métabolique des cellules INS832/13 cryoconservées.

### **1.13 Modèles biologiques**

L'utilisation en biochimie et en recherche moléculaire de cellules  $\beta$  de culture primaire humaine est limitée par la disponibilité des tissus pancréatiques endocrines (Poitout and Robertson, 1996). Il est également pertinent de mentionner que les îlots peuvent se dégrader rapidement suivant l'isolation. En effet, les réponses sécrétoires

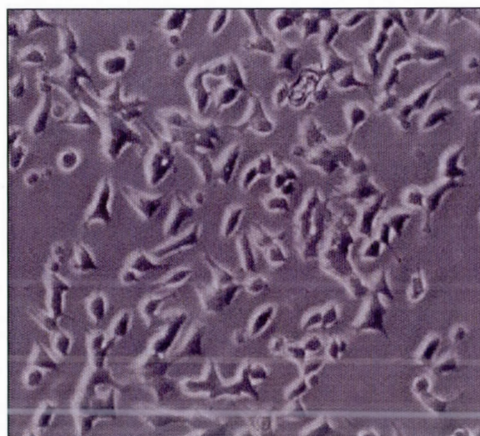
au glucose et ses potentiateurs commencent à décliner dans les heures qui suivent l'isolation des îlots et leur maintien en culture tissulaire (Hohmeier *et al.*, 2000). Ainsi une lignée cellulaire qui répond de façon stable à des sécrétagogues pertinents physiologiquement pourrait être utile pour définir les mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline, lesquels pourraient éventuellement conduire au développement de nouvelles substances pharmaceutiques pouvant traiter le diabète. Par ailleurs, une lignée cellulaire pouvant imiter fidèlement la fonction des îlots pancréatiques normaux pourrait servir de substituts pour les îlots dans la thérapie de transplantation pour le diabète de type I.

Même si le comportement de ces lignées cellulaires sécrétrices d'insuline (ex : INS832/13) ne mime pas parfaitement la physiologie des cellules primaires  $\beta$ , elles demeurent des outils précieux pour l'étude des événements moléculaires étant à la base des fonctions et dysfonctionnements des cellules  $\beta$  (Bhathena *et al.*, 1980). Plusieurs lignées de ce type furent développées à partir d'insulinome transplantable de rat induit par rayon X (Chick *et al.*, 1977).

Les études de cryoconservation ont été effectuées avec des cellules INS832/13. Cette lignée nous a été fournie par l'équipe du Dr. Prentki (Centre du diabète de Montréal et Université McGill) et elle est une lignée INS-1 modifiée (Figure 1.3). La lignée cellulaire parentale INS-1 est utilisée en laboratoire afin de mieux comprendre les mécanismes biochimiques impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Elle sert de modèle pour les mécanismes de signalisation métabolique dans les cellules. Elle est capable de sécréter de l'insuline en réponse à des concentrations de glucose dans un intervalle physiologique. Cependant, l'ampleur de la réponse est bien moindre que celle observée chez des îlots de rats fraîchement isolés. La sécrétion d'insuline augmente de 2 à 4 fois en réponse au glucose chez les cellules INS-1 laquelle est nettement inférieure à celle qui est réalisable avec des îlots primaires fraîchement isolés qui peut être de 15 fois (Hohmeier *et al.*, 2000).

La lignée modifiée INS832/13 provient des cellules parentales INS-1 transfectées avec un plasmide contenant le gène de l'insuline humaine sous le contrôle d'un promoteur de cytomégalovirus et un gène de résistance à la néomycine. Cette souche a été sélectionnée car elle faisait partie des clones qui répondaient fortement à la stimulation au glucose. Les cellules INS832/13 possèdent un phénotype qui évolue avec le temps. Le phénotype le plus intéressant pour la production d'insuline se situe entre les passages 54 et 65.

Les cellules ont été maintenues en culture dans des flacons BD (Becton Dickinson) ( $5 \times 10^6$  cellules/flacon) avec du RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) dit complet, i.e., supplémenté avec 10 mM d'HEPES (*Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic Acid*), 10% de SVF (sérum de veau fœtal) inactivé par la chaleur, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de sodium pyruvate et 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoethanol).



**Figure 3 :** Cellules INS832/13 (image tirée de nos travaux, 150X)

#### 1.14 Protocole optimisé de cryoconservation pour la lignée cellulaire INS832/13

Nous avons procédé à l'adaptation d'un milieu de cryoconservation utilisant des protéines de blé (Hamel *et al.*, 2006) et ayant déjà fait ses preuves avec des hépatocytes pour la lignée cellulaire pancréatique INS832/13. Initialement, la cryoconservation des cellules a été effectuée par l'ajout, dans le milieu de culture, de protéines de blé (extraits bruts purifiés avec de l'acétone) et des protéines suivantes, WCS120 et TaIRI et a été comparée avec la méthode au DMSO. Les protéines recombinantes efficaces pour la cryoconservation des hépatocytes n'ont pas bien fonctionné avec les cellules INS832/13. Cela explique, entre autre, pourquoi une méthode spécifique a dû être développée afin de cryoconserver les cellules INS832/13. Le mélange optimisé de cryoconservation (détails décrits dans la partie 5, résultats de l'article) pour les cellules INS832/13 consiste en un milieu contenant des protéines de plantes et des composantes telles que la lécithine, du glycérol et du n-méthylpyrrolidone (Grondin *et al.*, 2013). Ces dernières composantes avaient non seulement pour but d'améliorer le milieu de cryoconservation des cellules INS832/13 mais leurs ajouts avaient également pour but de se débarrasser des protéines de blé adhérentes aux cellules après décongélation afin d'augmenter leur efficacité d'adhésion au substrat.

Les cellules INS832/13 possédant une capacité de sécrétion d'insuline ont été conservées en culture en flacon et ont été cryopréservées soit ( $0,75 \times 10^6$  cellules/mL) avec des protéines de plantes, soit avec 10% de DMSO et 50% de SVF. Les cellules fraîches ont servi de témoins. Les cryotubes contenant les cellules INS832/13 ont été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour une journée à un taux de congélation de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  dans des contenants à congélation contrôlée (Nalgene, Rochester, NY) et ont ensuite été transférés dans l'azote liquide jusqu'à utilisation (au minimum 7 jours). Les cellules furent décongelées rapidement dans un bain à  $37^{\circ}\text{C}$  en agitant doucement. Selon les



tests effectués, elles furent soit remises en culture dans du RPMI avec amphotéricine, soit elles ont subi une série de lavage et de centrifugation afin d'être mises en plaques pour des tests métaboliques.

La viabilité et la morphologie ont été déterminées chez les cellules fraîches et cryopréservées après 0, 24 et 48 heures en culture. La viabilité a été évaluée par cytométrie en flux avec un double marquage au Sytox green et à l'iodure de propidium (Reader *et al.*, 1993). La morphologie des cellules INS832/13 et leur capacité à former des monocouches en culture (plateability) ont été évaluées par microscopie en contraste de phase.

Des tests de métabolisme ont été effectués sur les cellules cryoconservées, de même que sur les cellules fraîches afin de tester leurs fonctions biologiques et pancréatiques. Les tests consistaient essentiellement en la sécrétion d'insuline et de C-peptide après stimulation au glucose mesurée par ELISA; du captage de glucose et l'expression de *Glut 1, 2,3 (Glucose Transporter)* par qRT-PCR (*Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*). La sécrétion d'insuline et de C-peptide sont les deux paramètres qui sont vérifiés en premier et qui permettent de déterminer si les cellules conservent leurs fonctions métaboliques.

## CHAPITRE II -ARTICLE SCIENTIFIQUE

### CRYOPRESERVATION OF INSULIN-SECRETING INS832/13 CELLS USING A WHEAT PROTEIN FORMULATION

Melanie Grondin<sup>abc</sup>, Isabelle Robinson<sup>abc</sup>, Sonia Do Carmo<sup>c1</sup>, Mohamed A. Ali-Benali<sup>bc</sup>, François Ouellet, Catherine Mounier<sup>c</sup>, Fathey Sarhan, Diana A. Averill-Bates<sup>bc</sup>

<sup>a</sup>Equal contribution

Département des Sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec Canada H3C 3P8

<sup>b</sup>Centre TOXEN

<sup>c</sup>Centre BIOMED

<sup>1</sup>Present address: Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, 3655 Promenade Sir-William-Osler, Montréal, Québec Canada H3G 1Y6

Publié dans la revue *Cryobiology*, *Cryopreservation of insulin-secreting INS832/13 cells using a wheat protein formulation*, volume 66, issue 2, avril 2013, pages 136-143.

#### Contribution de l'auteur principal et des co-auteurs

Isabelle Robinson : recherche bibliographique, expérimentation (culture cellulaire, cryoconservation, tests de viabilité et de cytométrie en flux, morphologie, métabolisme, extractions d'ARN), mise au point et optimisation des protocoles, interprétation des données, rédaction de la première version du manuscrit.



Mélanie Grondin : recherche bibliographique, expérimentation (culture cellulaire, cryoconservation, tests de viabilité et de cytométrie en flux, morphologie, métabolisme, extractions d'ARN), mise au point et optimisation des protocoles, interprétation des données, rédaction de la première version du manuscrit.

Diana Averill : encadrement/supervision des expériences/rédaction et révision du manuscrit

Fathey Sarhan : encadrement/supervision des expériences/rédaction et révision du manuscrit

François Ouellet : supervision des expériences/rédaction et révision du manuscrit

Sonia Do Carmo : mis au point des protocoles : extractions d'ARN, Rt-PCR quantitative et métabolisme

Mohamed Ali Ali-Benali : extractions d'ARN, Rt-PCR quantitative

Catherine Mounier : supervision des expériences et révision du manuscrit

## 2.1 Résumé

Le diabète représente une épidémie globale affectant 285 millions de personnes à travers le monde. Pour les patients sévèrement atteints du diabète de type I, la transplantation d'un pancréas ou celle d'îlots de Langerhans est la seule option thérapeutique possible. La transplantation d'îlots de Langerhans a pour principal problème le faible taux d'îlots fonctionnels disponibles et connaît également des limitations dans les procédures de cryoconservation. Ainsi, l'amélioration des procédures de cryoconservation est nécessaire afin d'augmenter la disponibilité d'îlots fonctionnels pour des applications cliniques. C'est dans cette optique qu'un protocole de cryoconservation de cellules pancréatiques à l'aide de protéines issues du blé qui s'accumulent naturellement dans des plantes tolérantes au froid fut mis au point. Une préincubation des cellules avec 1% de lécithine 1% de glycérol 1% de N-méthylpyrrolidone suivie par une cryoconservation avec des protéines partiellement purifiées issues du blé a amélioré la viabilité et les propriétés de sécrétion de l'insuline des cellules INS832/13, comparativement à la cryoconservation avec 10% de diméthylsulfoxyde (Me<sub>2</sub>SO). Le principal facteur qui a augmenté l'effet cryoprotecteur de la formulation de protéines de blé a été la pré-incubation avec une substance lipidique, la lécithine. Les profils d'expression des gènes impliqués dans les fonctions métaboliques et de signalisation des cellules pancréatiques (*Ins*, *Glut1/2/3*, *Pdx1*, *Reg1a*) étaient similaires entre les cellules fraîches et celles cryoconservées avec cette formulation de protéines de plantes. Cette nouvelle technologie basée sur l'utilisation des plantes, laquelle est non toxique et ne contient aucun matériau animal est une alternative prometteuse au Me<sub>2</sub>SO pour la cryoconservation des cellules pancréatiques sécrétrices d'insuline.

**Mots-clé :** cryoconservation; protéines de plantes; viabilité; cellules bêta du pancréas; lipides; sécrétion d'insuline

## 2.2 ABSTRACT

Diabetes is a global epidemic that affects about 285 million people worldwide. For severely-ill patients with type I diabetes, whole pancreas or islet transplantation is the only therapeutic option. Islet transplantation is hindered by the scarce supply of fresh functional islets and limitations in cryopreservation procedures. Thus, improved cryopreservation procedures are needed to increase the availability of functional islets for clinical applications. Towards this goal, this work developed a cryopreservation protocol for pancreatic cells using proteins that accumulate naturally in freezing-tolerant plants. A preincubation of cells with 1% lecithin-1% glycerol-1% N-methylpyrrolidone followed by cryopreservation with partially purified proteins from wheat improved the viability and insulin-secreting properties of INS832/13 cells, compared to cryopreservation with 10% dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO). The major factor that enhanced the cryoprotective effect of the wheat protein formulation was preincubation with the lipid lecithin. Expression profiles of genes involved in metabolic and signaling functions of pancreatic cells (*Ins*, *Glut1/2/3*, *Pdx1*, *Reg1α*) were similar between fresh cells and those cryopreserved with the plant protein formulation. This novel plant-based technology, which is non-toxic and contains no animal material, is a promising alternative to Me<sub>2</sub>SO for cryopreservation of insulin-secreting pancreatic cells.

**Key words:** cryopreservation; plant protein; viability; pancreatic beta-cells; lipid; insulin secretion

## 2.3 INTRODUCTION

Diabetes, the world's 4th leading cause of death, is a global epidemic that affects an estimated 285 million people worldwide (Canadian Diabetes Association, 2012; [www.diabetes.ca](http://www.diabetes.ca)). With 7 million new cases diagnosed worldwide each year, the total number of people affected is expected to reach 438 million by 2030. There are two main types of diabetes: type I and type II. Approximately 10% of diabetics have type I diabetes while 90% are afflicted with type II diabetes. Type II diabetes can often be controlled by lifestyle management, whereas juvenile onset type I diabetes is an unpreventable disease that requires daily insulin injections. The causes of type I diabetes are unknown, but genetic and environmental factors appear to be involved. It is an autoimmune disease that results in the destruction of insulin-secreting beta cells of the Islets of Langerhans. This renders the pancreas unable to produce insulin and results in glucose accumulation in the blood, which leads to multiple health problems. Life expectancy for people with type I diabetes may be shortened by about 15 years.

There is no cure for type I diabetes and treatment with insulin is often not sufficient to prevent long-term complications of the disease such as blindness, cardiovascular disease, stroke, nerve problems and kidney disease. For severely-ill patients, alternative therapies involve the transplantation of either whole pancreas or Islets of Langerhans (Kabelitz *et al.*, 2008 ; Russ and Efrat, 2011 ; Shapiro *et al.*, 2006 ; Warnock and Rajotte, 1992). Islet transplantation is preferred over organ transplantation because it is less invasive and safer. However, a major limitation is that islet transplantation requires a large number of human islets (usually from two or three donors), which are in scarce supply. The long-term storage of islets in cell and tissue banks is therefore essential for transplantation, blood type and histocompatibility matching, testing of viability, sterility and islet function, as well as transportation to distant sites. Cryopreservation is one of the options for long-term

storage of islets. However, currently used islet cryopreservation protocols are suboptimal since they use toxic chemicals such as dimethyl disulfoxide ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), which cause extensive loss of islet mass (~50% survival) and inhibit glucose-induced insulin secretion (McKay and Karow, 1983b ; Rajotte, 1999 ; Taylor and Baicu, 2009 ; Warnock *et al.*, 1994).

To find more effective and less toxic alternatives to  $\text{Me}_2\text{SO}$ , scientists have long considered using natural substances produced by organisms that survive freezing conditions, such as freezing tolerant hardy plants. To ensure survival, several hardy plants have evolved efficient mechanisms to tolerate extreme freezing winter conditions. Hardy winter wheat varieties are inheritably more freezing tolerant compared to their less hardy, spring counterparts, even without exposure to the inductive low temperatures. This is due to the presence of substances known to protect plants against cold and freezing stresses, such as freezing tolerance associated proteins, antifreeze proteins (AFPs) , sugars (glucose, fructose, sucrose and trehalose), glycine betaine (an organic osmolyte), antioxidants, and phenolic compounds (reviewed in (Thomashow, 1999)).

To mimic the strategy of nature that winter hardy wheat use to tolerate freezing, we developed a novel protocol using soluble proteins from winter wheat plant extracts (WPE) as a cryopreservative agent for mammalian cells. WPEs from winter wheat were shown to efficiently cryopreserve primary cultures of rat hepatocytes (Grondin *et al.*, 2008 ; Hamel *et al.*, 2006). In view of the promising results obtained for hepatocytes, it was therefore of interest to test the efficacy of these plant proteins for cryopreservation of other cell types. Given that cells and tissues are complex and dynamic structures with a wide range of morphological, biochemical and physiological characteristics, customized cryopreservation strategies need to be designed for each biological system to ensure maximum cell viability and functional capacity. This study investigates the ability of a mixture of winter wheat proteins to



cryopreserve insulin-secreting INS832/13 pancreatic cells, while allowing them to maintain their metabolic functions. Lipids appear to play a beneficial role in cryoprotection (Graham and Foote, 1987b ; Holovati *et al.*, 2009); therefore we determined whether plant-derived lipids could enhance the cryoprotective effect of plant proteins.

## **2.4 MATERIALS AND METHODS**

### **2.4.1 Preparation of Plant Protein Extracts**

Winter wheat plants (*Triticum aestivum* L. cv Clair) were germinated and grown in water-saturated vermiculite for 10 days at 20°C, 70% relative humidity, and a 16 h photoperiod under an irradiance of 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ . Partially purified wheat protein extracts (WPE) were prepared as described previously (Grondin *et al.*, 2009a), except that overnight precipitation of proteins with acetone was performed. Protein integrity was validated and quantified by SDS-PAGE.

### **2.4.2 Cell Culture**

The insulin-secreting INS832/13 cell line (kindly provided by Dr Marc Prentki, Montreal Diabetes Centre) was used in this study. This cell line was generated by transfection of INS-1 cells to stably express the human proinsulin gene (Hohmeier *et al.*, 2000). The INS-1 cell line was established from cells isolated from an X-ray-induced rat transplantable insulinoma (Asfari *et al.*, 1992). INS-1 cells retain a high degree of differentiation, and they stably mimic the function of  $\beta$  cells within the normal pancreatic Islets of Langerhans. INS832/13 cells exhibit markedly enhanced



and stable responsiveness to glucose compared to INS-1 cells. INS832/13 cells (passages 30-70) were grown in monolayer in tissue culture plates in RPMI-1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 mM HEPES, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS Premium; Wisent, Montreal QC, Canada), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (thereafter called «complete RPMI») at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. The doubling time of INS832/13 cells is around 100 h and these cells are passaged every 8 days (Hohmeier *et al.*, 2000). At 80% confluence, cells were washed twice with PBS and detached using trypsin-EDTA (Sigma, St. Louis MO, USA). After centrifugation, the pellet was resuspended in complete RPMI.

### 2.4.3 Cell Cryopreservation

Cells ( $0.75 \times 10^6$ ) were aliquoted into cryovials in 0.5 mL of complete RPMI without antibiotics, and then supplemented with the WPE (Grondin *et al.*, 2008). Cells cryopreserved with 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS served as a reference, and complete RPMI without antibiotics as a negative control. For optimization of the cryopreservation protocol, cells were also preincubated for 1 h at 37°C with mixtures of lipids (lecithin, glycerol, glycerin) and/or N-methylpyrrolidone (NMP) at 1% each (see figures for details), before addition of the WPE. When present, the final concentrations of lecithin, glycerol, glycerin and NMP in the cryopreservation mixture were 0.4% (except for Fig. 2.2). The rationale for using these substances is described in the Results section. The WPE was resuspended in ice-cold RPMI medium before addition to the cell suspension. Tubes containing cells were frozen at a cooling rate of 1°C/min in a freezing container ("Mr. Frosty"; Nalgene, Rochester NY, USA) in a -80°C freezer for 24 h, and then transferred to liquid nitrogen for at least 7 days prior to thawing. Frozen cells were thawed quickly by gentle agitation in

a 37°C water bath and then analyzed for viability, cellular functions and gene expression.

#### **2.4.5 Cell Viability**

Viability was determined immediately after thawing by staining cells with 9 µM SYTOX Green (Molecular Probes, Eugene OR, USA) in RPMI medium for 5 min. SYTOX Green is a nucleic acid stain that readily enters cells with compromised cytoplasmic membranes. Cells (10,000) were analyzed by flow cytometry (excitation at 488 nm) using a FACScan (Becton Dickinson, Oxford, UK). The number of cells showing green fluorescence was determined with the Cell Quest software (Becton Dickinson).

#### **2.4.6 Cell Adhesion**

For adhesion, thawed cell suspensions were washed twice with cold PBS containing 0.1% Tween-20 (unless otherwise specified; see Tables S2 and S3) and centrifuged at 1,500g for 2 min at 4°C. Cells ( $3.75 \times 10^5$ ) were then plated and cultured in 6-well culture dishes in complete RPMI medium containing 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2.5 ng/mL amphotericin B. Cell adhesion was observed 48 h after plating in dishes using an Eclipse Ti 3000 inverted microscope (Nikon, Montreal QC, Canada) with a 40X Hoffman objective. In general, cells were either adherent on plastic dishes or completely non-adherent (-) where they floated in the culture medium. Adhesion was qualified as strong, medium or weak for degrees of confluence of 100%, 75% and 50%, respectively.

#### 2.4.7 Cellular Morphology

Thawed cells were washed and cultured for 1 and 14 days on poly-D-lysine-coated coverslips. Morphology was evaluated by microscopy and photographs were analyzed using ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

#### 2.4.8 Glucose-Induced Insulin and C-Peptide Secretion

Thawed cells were washed and cultured for 5 and 14 days prior to secretion tests. The 14-day time point refers to cells that had been passaged only once after thawing. Cells were incubated in complete RPMI with low glucose (1 mM) for 2 h in 48-well plates. They were washed and preincubated for 1 h in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 10 mM HEPES pH 7.4 (KRBH) and 0.07% bovine serum albumin (BSA). Cells were then incubated in fresh KRBH containing 1 mM or 15 mM glucose for 1 h. The concentrations of insulin (Nolan *et al.*, 2006) and C-peptide (Omori *et al.*, 2007) released into the media were determined by ELISA (Merckodia, Salem, NC, USA), following the manufacturer's instructions. DNA was extracted using phenol-chloroform and quantified by spectrophotometry. Values were normalized to the DNA content (ng insulin/ug DNA and pmol C-peptide/ug DNA), and then glucose-induced stimulation was calculated as the 15 mM/1 mM ratio for both insulin and C-peptide release.

#### 2.4.9 Glucose Uptake

Cells were thawed and washed, and then cultured in RPMI medium deprived of serum and glucose for 2 h in 96-well plates, and then preincubated for 2 h in KRBH. The glucose uptake assay was initiated by replacing the KRBH with 200  $\mu$ l of KRBH

containing 0.4  $\mu\text{Ci}$  of 2-deoxy- $^3\text{H}$ -D-glucose (Perkin-Elmer, Woodbridge ON, Canada) (Lecavalier and Mackillop, 1985). As a negative control, 20  $\mu\text{M}$  of cytochalasin B was added to the assay medium. After 15 min, transport was blocked by washing the cells 3 times with ice-cold PBS containing 1  $\mu\text{M}$  cytochalasin B. The cells were solubilized with 0.4% SDS and the radioactivity was detected using a liquid scintillation counter (Tri-Carb 2800TR, PerkinElmer, Shelton, CT, USA). The net values for glucose uptake were obtained by subtracting the non-specific uptake in the presence of cytochalasin B. Results are expressed as pmol  $^3\text{H}$ -D-glucose/ $\mu\text{g}$  DNA/min.

#### 2.4.10 RNA Extraction and Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy Mini Kit and reverse transcribed using the Omniscript RT Kit (QIAGEN, Mississauga ON, Canada). Primers used for gene expression analysis are given in Table S1. The resulting cDNAs were PCR-amplified for 35 cycles with specific primers for 18S rRNA, insulin (*Ins*), regenerating islet-derived 1 alpha (*Reg1a*), pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx1*), and glucose transporters 1, 2 and 3 (*Glut1*, *Glut2*, *Glut3*). Control amplifications of RT reactions performed without reverse transcriptase confirmed that there was no DNA contamination in the RNA samples.

#### 2.5 Statistical analysis

Comparison between groups and analysis for differences between means of control and treated groups were performed using ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test ( $P < 0.05$  significance level).

## 2.6 RESULTS

### 2.6.1 Wheat protein extracts can efficiently cryopreserve INS832/13 cells

The cryopreservation efficacy of the WPE was evaluated in insulin-secreting INS832/13 cells and compared to the classical cryopreservant Me<sub>2</sub>SO. We first confirmed that the WPE was non-toxic to fresh (non-cryopreserved) cells. This was shown by the lack of adverse effects on glucose-induced insulin secretion properties after 30 min of incubation of cells with the WPE (Fig. 2.7). Subsequently, the cryoprotective ability of the WPE was determined by measuring cell viability. Post-thaw viability increased as a function of protein concentration from 0.5 to 20 mg of WPE proteins/7.5 x 10<sup>5</sup> cells (Fig. 2.1). Viability of cells cryopreserved with the WPE at 5 mg of protein/7.5 x 10<sup>5</sup> cells was about 70% and equivalent to that of cells cryopreserved with Me<sub>2</sub>SO (10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS). At a higher concentration of the WPE (20 mg protein/7.5 x 10<sup>5</sup> cells), viability was similar to that of fresh cells (>90%). When BSA was tested as an alternative protein for cryopreservation (20 mg/7.5 x 10<sup>5</sup> cells), post-thaw viability was very low (<10%), indicating that high cell viability following cryopreservation with the WPE is specific to the wheat proteins (Fig. 2.1). The viability of cells cryopreserved with RPMI medium alone, without proteins, was also very low (<10%) (Fig. 2.1). An important factor for cryopreservation of cells for clinical purposes is to avoid animal products for biosafety reasons. These results show that wheat proteins can effectively and specifically maintain high viability in insulin-secreting cells during cryopreservation without animal serum or Me<sub>2</sub>SO.

In addition to high post-thaw viability, an important factor for assessing the efficiency of a cryopreservation protocol is whether cells are able to resume their normal metabolic activities once back in culture. Adhesion is critical for allowing

cells to resume their growth and to perform metabolic activities. However, fewer INS832/13 cells (~25% compared to fresh cells) were able to adhere to culture dishes following cryopreservation with the WPE, in contrast to 10% Me<sub>2</sub>SO (~50%) (data not shown). The loss of cell adhesion had an important impact on insulin-secreting properties, which is a key metabolic function in pancreatic cells. Indeed, there was a pronounced 3 to 5-fold decrease in glucose-induced insulin secretion in cells cryopreserved with the WPE, compared to fresh and Me<sub>2</sub>SO-cryopreserved cells (data not shown). Observations by microscopy revealed that after thawing, the wheat proteins appeared to form a gel-like matrix that coated the cell's plasma membrane. The coating gave cells a blurry appearance and irregular shape (Fig 2.2A), compared to cells that were cryopreserved with Me<sub>2</sub>SO (Fig 2.2B). This matrix resisted extensive washing with PBS and likely explains the low cell adhesion. To improve adhesion properties in INS832/13 cells cryopreserved with the WPE, numerous procedures were tested to remove the membrane coating. These procedures, which included washing cells post-thaw with different buffers, enzymes or detergents (Table S2), and preincubation of cells with different plant oils prior to cryopreservation with the WPE (Table S3), did not remove the protein coating. We subsequently tested other procedures with lipids.

#### **2.6.2 Preincubation with lipids prevents membrane protein coating and improves post-thaw viability and adhesion of INS832/13 cells**

To improve cryopreservation properties of the WPE, the next approach that was tested to prevent the membrane protein coating involved preincubating pancreatic cells with lipids such as lecithin, glycerol and glycerin (plant-derived glycerol). Several concentrations of these substances were tested, with or without the WPE (Fig. 2.3). Post-thaw viability was low (<10%) in cells that were preincubated with 0.25% to 1% glycerol or glycerin prior to cryopreservation (without the WPE). In contrast,



post-thaw viability was high in cells cryopreserved with lecithin alone, at 48% to 90% for 0.25% to 1% lecithin, respectively. Addition of the WPE (5 mg) for low temperature storage caused a pronounced increase in post-thaw viability of cells that had been preincubated with glycerin or glycerol (Fig. 2.3). The highest viability was obtained when cells were preincubated with 1% lecithin, and then cryopreserved either with or without the WPE (5 mg) (Fig. 2.3). In addition, preincubation with each of these lipid substances partially prevented protein coating of membranes and allowed increased adhesion of cells (about 50%). Despite the high viability with 1% lecithin, metabolic function was suboptimal (see next section).

Subsequently, combinations of lecithin and glycerol or glycerin were tested with the WPE to determine if they could improve post-thaw viability and metabolic functions. Post-thaw viability of cells was improved by more than 25 to 30% when INS832/13 cells were preincubated for 1 h with 1% lecithin prior to cryopreservation with the WPE (Fig. 2.4). Viability was similar to that of fresh cells (>90%, no significant difference), and significantly higher than that of Me<sub>2</sub>SO-cryopreserved cells (approx. 75%). Moreover, the addition of glycerol or glycerin (1% each) to lecithin in the preincubation mixture provided an advantage by preventing the protein coating, and consequently, cell adhesion was restored to about 100%. Therefore, the best cryopreservation medium for INS832/13 cells consisted of 5 mg of WPE protein/7.5 x 10<sup>5</sup> cells, preincubated for 1 h with a combination of 1% lecithin and 1% glycerin (Fig. 2.4).

Curiously, post-thaw viability (Fig. 2.4) and stimulation ratios for glucose-induced insulin secretion (Fig. 2.5A) were significantly lower for the lecithin-glycerol-WPE mixture compared to the lecithin-glycerin-WPE mixture for cryopreservation of INS832/13 cells. This discrepancy was puzzling, given that glycerin and glycerol have the same molecular structure. However, glycerin is produced from plants and its synthesis involves a trans-esterification step, while glycerol is of animal origin and its

synthesis requires a saponification step. We verified whether a by-product generated during synthesis of either of these two compounds could be responsible for the difference in metabolic activity. A GC/MS analysis revealed that glycerin contains similar proportions (approx. 50:50) of glycerol and the by-product N-methylpyrrolidone (NMP). We next determined whether NMP could be beneficial during cryopreservation. When cells were preincubated with 1% NMP alone, post-thaw viability was low (<5%) (Fig. 2.4). However, high viability (>90%) was obtained when cells were preincubated for 1 h with a combination of lecithin-glycerol-NMP (1% each), and was equivalent to that of the lecithin-glycerin mixture and of fresh cells (Fig. 2.4). This suggests that the NMP contaminant was contributing to the cryoprotective effect of glycerin. Furthermore, when cells were preincubated with the lecithin-glycerol-NMP mixture prior to cryopreservation (Fig. 2.2 C), there was no protein coating and after 1 or 14 days in culture. The morphology of these thawed cells more closely resembled fresh cells (Fig. 2.2 D), compared to cells that were cryopreserved with the WPE alone (Fig. 2.2 A) or with Me<sub>2</sub>SO (Fig. 2.2 B). Given that glycerol is more readily available than natural glycerin, further experiments were carried out using glycerol and NMP.

### **2.6.3 Metabolic functions are maintained in INS832/13 cells cryopreserved with the optimized WPE formulation**

For pancreatic cells, key metabolic functions include glucose-induced secretion of insulin and C-peptide, and glucose uptake. Therefore, stimulation ratios for glucose-induced insulin and C-peptide secretion were determined in thawed INS832/13 cells after 5 and/or 14 days in culture. Stimulation ratios for glucose-induced insulin release on day 14 were significantly lower ( $P < 0.001$ ) in cells cryopreserved with the WPE following preincubation with lecithin alone or combined with glycerol or NMP,

compared to fresh cells (Fig. 2.5A). However, the highest stimulation ratios for insulin release were obtained in cells that were preincubated with the combinations lecithin-glycerol-NMP or lecithin-glycerin, prior to cryopreservation with the WPE (Fig. 2.5A). These stimulation ratios were not significantly different from the ratio in fresh cells, and were significantly higher ( $P < 0.001$ ) than that in Me<sub>2</sub>SO-cryopreserved cells. For release of C-peptide, the optimal stimulation ratio occurred in cells that were preincubated with lecithin-glycerol-NMP, prior to cryopreservation with the WPE, and there was no significant difference from fresh cells (Fig. 2.5B). These higher stimulation ratios for insulin and C-peptide were due to an increase in the glucose-induced rates, whereas the basal rates did not change (data not shown). Glucose uptake was functional in cells that were cryopreserved either with the WPE following preincubation with lecithin-glycerin, or with 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS (Fig. 2.8). Levels of glucose uptake were not significantly different when compared to fresh cells.

#### **2.6.4 Expression of key genes associated with pancreatic functions is comparable between fresh cells and those cryopreserved with the WPE formulation**

We also determined whether cryopreservation with the WPE could alter the expression of key genes associated with  $\beta$ -cell metabolism and function: *Glut1*, *Glut2*, *Glut3*, *Ins*, *Pdx1* and *Reg1 $\alpha$* . *Glut* genes encode for glucose transporters expressed in  $\beta$  cells. These include glucose transporter 1 (GLUT1), responsible for basal glucose uptake, GLUT2, a low affinity glucose transporter, and GLUT3, a high affinity transporter (Khan and Pessin, 2002). Preproinsulin, the primary translation product of the insulin gene (*Ins*), is a precursor that is processed to proinsulin, which undergoes proteolytic cleavage to produce insulin and C-peptide (Bugos *et al.*, 1998). In response to insulin, increased expression of the gene encoding the transcription

factor pancreas and duodenal homeobox-1 (Pdx1) occurs. This transcription factor is important for survival and differentiation of  $\beta$  cells (Prentki and Nolan, 2006) and primarily acts by up-regulating the transcription of several  $\beta$  cell-specific genes, including *Ins* and *Glut2* (Demel and De Kruyff, 1976). The regenerating islet-derived 1 alpha (*Reg1a*) gene encodes a protein that is associated with the regeneration of pancreatic islets (Grankvist *et al.*, 1981). Data from semi-quantitative RT-PCR show that at day 14 post-adhesion, there were no significant differences in the expression levels of all six genes between fresh cells and those that were cryopreserved with the WPE (following preincubation with lecithin-glycerol-NMP) or with 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS (Fig. 2.6).

## 2.7 Discussion

Overall, our cellular, biochemical and molecular analyses show that the plant-based cryopreservation formulation maintains cell viability, adhesion and metabolic functions following ultra-low temperature storage of insulin-secreting cells. Our optimised cryopreservation protocol for INS832/13 cells involves a two-step procedure that is based on the preincubation of  $7.5 \times 10^5$  cells with a mixture of lecithin-glycerol-NMP (1% each) or lecithin-glycerin for 1 h at 37°C followed by the addition of 5 mg of WPE and immediate cryopreservation. The preincubation with the mixture has the added benefit that the quantity of wheat proteins required for cryopreservation could be decreased from 20 mg to 5 mg per  $7.5 \times 10^5$  cells.

During initial cryopreservation experiments, the plant proteins coated the cell membrane, which interfered with cell adhesion and glucose-induced insulin secretion in thawed cells. The decrease in glucose sensitivity due to cell membrane coating is likely explained by blocked access of glucose to glucose transporters. Glucose-

induced insulin secretion was functional when cells were incubated with the WPE at 37°C, indicating that this membrane coating only occurred during freezing of the proteins. During the freezing of a protein in solution, there are rapid increases in concentrations of solutes due to ice formation, and changes in pH and protein dehydration, which can cause a decrease in protein stability due to denaturation or changes in folding (Pikal-Cleland *et al.*, 2000). Therefore, it appears that freezing may modify the plant proteins, causing them to become gel-like and to adsorb strongly to membranes of INS832/13 cells. Another explanation could be changes in membrane structure and fluidity that arise during freezing (Arav *et al.*, 1996), which could render the membrane more susceptible to adhesion by the wheat proteins.

The protein membrane-coating phenomenon observed for INS832/13 cells did not occur during cryopreservation of hepatocytes with the WPE. However, these are two very different cellular systems. The hepatocytes are primary cultures of cells isolated from liver, whereas INS832/13 is a continuous cell line that can be maintained in culture after adherence in dishes. Hepatocytes are differentiated cells that have a polarized nature (Arterburn *et al.*, 1995). Compared to cell lines, the hepatocyte membrane is less uniform and composed of several domains: apical (or canicular) and basolateral (lateral and sinusoidal). These domains have different biochemical compositions including different membrane receptors and enzymes. Hepatocytes are cuboidal, have numerous microvilli, and specialized junctions and bile canaliculi form within the membranes of adjacent cells. The reason for this difference in protein membrane coating between hepatocytes and INS832/13 cells remains unknown.

The WPE was previously reported to successfully cryopreserve primary cultures of hepatocytes, which exhibited high viability, good adhesion, and retained hepatocyte-specific functions such as albumin secretion and induction of cytochrome P450 (CYP) isoenzymes (Grondin *et al.*, 2009a, 2009b ; Grondin *et al.*, 2008). Due to membrane coating, the cryopreservation protocol developed for hepatocytes was

modified for INS832/13 cells to avoid interference with adhesion and metabolic functions. This modified protocol with the lipid mixture improved the cryoprotective effects of the WPE by preventing adsorption of wheat proteins to the membrane, thus allowing cells to adhere to culture plates and maintain their metabolism and gene expression post-thaw. This plant-based protocol was more effective than Me<sub>2</sub>SO for cryopreservation of insulin-secreting cells.

Cryopreservation-induced damage to cells appears to involve multiple mechanisms (Baust *et al.*, 2001 ; Karlsson and Toner, 1996). The formation of intracellular ice is known to cause damage during freezing of many different cell types (Karlsson *et al.*, 1993). Membrane damage and physical cell rupture that occur during cryopreservation have been attributed to intracellular ice crystal formation and increased solute levels. Moreover, extracellular ice can cause mechanical stress as well as cellular deformation (Karlsson and Toner, 1996).

The fundamental mechanisms involved in the cryoprotective effect of the wheat protein formulation are unknown. This is particularly difficult to establish since the principle component of the WPE, following partial purification by acetone, is a mixture of numerous proteins. It is likely that multiple mechanisms are involved, conferred mainly by the different plant proteins, but lecithin, glycerol and NMP also contribute. In addition, we do not know if these proteins can enter cells. Proteins are relatively large macromolecules and it seems unlikely that the wheat proteins would cross the cytoplasmic membrane; therefore, they are likely to exert their cryoprotective effects at the extracellular level. In general, soluble proteins are able to associate with membrane phospholipids through hydrophobic interactions (Kimelberg, 1976), although these could be somewhat diminished by association of low (1%) levels of lecithin with the membrane. It is possible that some of the plant proteins in the WPE possess properties that confer cryoprotective effects by stabilizing the cell membrane against freeze-induced injury, thus lessening physical



damage to the membrane due to the accumulation of extracellular ice. This mechanism has been described for cells of plants subjected to freezing (Thomashow, 2001). The WPE made from winter wheat contains many different proteins including basal levels of different freezing tolerance associated proteins such as dehydrins (e.g. WCS120, WCS19, WCOR410) and antifreeze proteins (AFPs; e.g. *TaIRI-2*) (unpublished observations). Dehydrins are thought to coat vital cellular proteins and protect them against conformational changes or agglomeration under conditions of stress such as freezing (Houde *et al.*, 1995). AFPs such as *TaIRI-2* can inhibit growth of ice crystals at the extracellular level, thus protecting the plasma membrane during freezing (Tremblay *et al.*, 2005). Other proteins in the WPE are very likely involved in the cryoprotective effect, but their identity remains to be determined. The advantages of using a natural plant-based technology for cell cryopreservation, as an alternate to  $\text{Me}_2\text{SO}$ , is that the protein extracts are non-toxic and contain no gluten or animal material.

Interestingly, antifreeze proteins from fish have been tested as cryoprotectants. Synthetic analogues of C-linked antifreeze glycoprotein (C-AFGP), which has antifreeze function in deep sea Teleost fish, were shown to be an alternative to  $\text{Me}_2\text{SO}$  for the cryopreservation of human embryonic liver cells (Leclerc *et al.*, 2011). A synthetic galactose-lacking fish AFGP analogue (syAFGP) improved pancreatic islet recovery post-cryopreservation as well as glucose-stimulated insulin secretion, when combined with  $\text{Me}_2\text{SO}$  and 10% fetal calf serum (FCS) (Matsumoto *et al.*, 2006). The fish antifreeze protein type III (AFP III) was reported to inhibit the ice nucleation process by adsorbing onto the surfaces of both ice and foreign (e.g. dust) particles (Du *et al.*, 2003). The adsorption of AFPs onto the surface of ice caused a similar effect on both the formation (nucleation) and growth kinetics of ice crystals.

The major factor that improved the cryoprotective effect of the WPE was preincubation with low levels of lecithin. Lecithin is a phospholipid that is composed

of glycerol, two fatty acids, choline and a phosphate group. The fatty acid components in lecithin can vary, in terms of the number of carbon atoms they contain and their saturation level. Lecithin will associate with phospholipids in the cell membrane through non-covalent hydrophobic interactions and will likely form a protective layer around cells. These lipid-lipid interactions appear to diminish the association between plant proteins and the cell membrane, thus preventing the membrane coating effect, and at the same time allow the proteins to provide cryoprotection, probably by decreasing extracellular ice formation. Several other studies have reported a role for lipids in cryoprotection. Liposomes were reported to stabilize membranes during freezing and thawing of bull sperm (Graham and Foote, 1987a) and red blood cells (Holovati *et al.*, 2009). In particular, unsaturated lipids such as 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) were protective. It appears that liposomes can alter membranes by promoting cholesterol-lipid exchange (Stoll *et al.*, 2011). Cholesterol depletion causes several alterations in physical properties of membranes including increased fluidity and permeability for hydrophilic solutes (Kimmelberg, 1978).

Interestingly, there was no difference in cell viability between 1% lecithin alone or combined with the WPE. However, although the WPE did not provide any added benefit with regard to viability following cryopreservation, the WPE did provide significant improvement to glucose-induced secretory function relative to 1% lecithin alone. It should be noted that viability was measured with SYTOX Green, which detects cytoplasmic membrane integrity but does not indicate the metabolic state of cells. Cells can suffer metabolic and functional damage even though the membrane is intact. Our data suggest that lecithin is protecting the cytoplasmic membrane against damage during cryopreservation, whereas the presence of plant proteins is also required to protect the metabolic function of cells, likely through multiple mechanisms as discussed above.

Glycerol is a highly viscous endogenous cryoprotective agent found in plants and insects that endure cold environments (Brisson *et al.*, 2001 ; Pegg, 2002). It decreases the amount of body water that freezes at a given temperature, thus preventing excessive cellular dehydration (Baust and Lee, 1981 ; Storey and Storey, 1992). Glycerol has been commonly used as a colligative cryoprotectant that penetrates cells (Polge *et al.*, 1949), generally at high concentrations of 5 to 30%. It binds to water molecules by forming strong hydrogen bonds and cryoprotects cells mainly by preventing intracellular ice formation (Rall *et al.*, 1978 ; Storey *et al.*, 1998). For INS832/13 cells, glycerol was used at low concentrations that did not cryoprotect cells when used alone, but good cryoprotection was obtained when combined with lecithin and NMP as a preincubation mix before the addition of plant proteins.

NMP, which was found to be a contaminant in plant-derived glycerin, is a biodegradable polar aprotic solvent that has strong solubilisation properties. It has been used as a cryoprotectant in microbiology and its cryoprotective activity was similar to that of glycerol and Me<sub>2</sub>SO in *E. aerogenes* (Nash *et al.*, 1963). The structural analogue polyvinylpyrrolidone (PVP) has been used commonly in both cryomicrobiology and general cryobiology (Hubalek, 2003). PVP is cell-impermeable and was shown to reduce damaging effects of intracellular ice formation during cryopreservation of adipose tissue derived adult stem cells (Guha and Devireddy, 2010). The cryoprotective mechanism of NMP is not known.

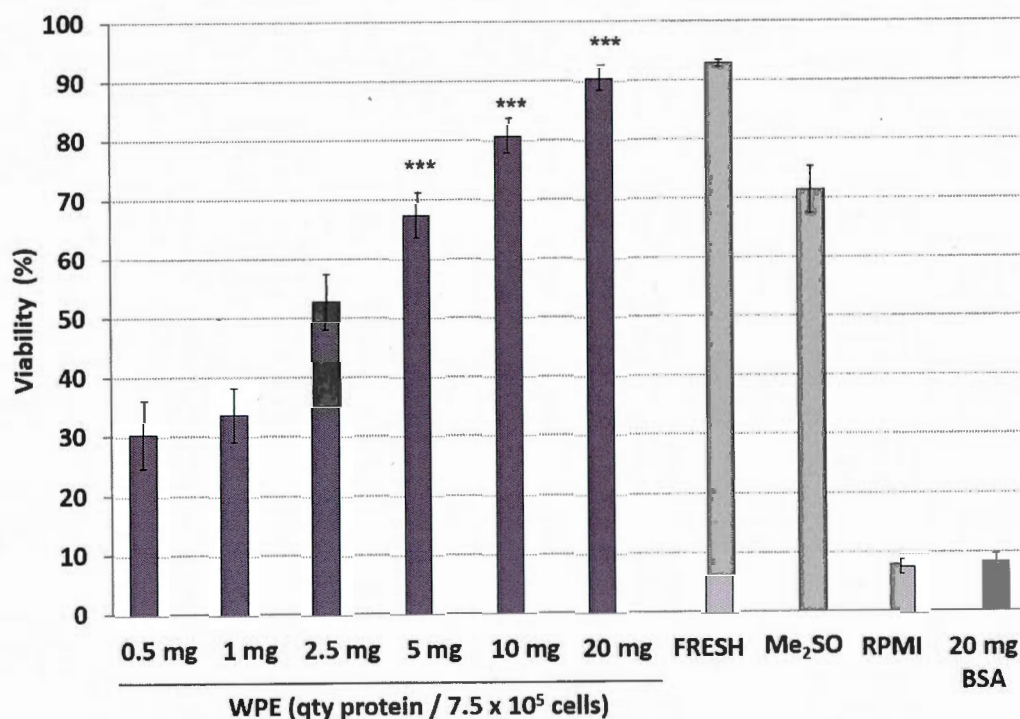
Current cryopreservation protocols for Islets of Langerhans are suboptimal and survival is only about 50% (Taylor and Baicu, 2009). Pancreatic islets are patches of endocrine tissue that consist of clusters of cells. They contain several different cell types, the most common being the insulin-secreting  $\beta$  cell. Important differences exist between individual insulin-secreting cells and pancreatic islets. Islets are separated from other pancreatic tissue by a thin connective tissue, and have intrinsic mass

transport limitations. They are highly vascularized organs and require a steady supply of nutrients and oxygen, as well as the removal of metabolites and secreted hormones. Should the coating of islets by the plant proteins occur during cryopreservation, there may be less interference with metabolic functions compared to individual insulin-secreting cells. Our future work will evaluate whether this non-toxic, natural plant-based formulation could provide an alternative technology for improving the cryopreservation of pancreatic islets, albeit a more complex system than insulin-secreting cells.

## **2.8 ACKNOWLEDGMENTS**

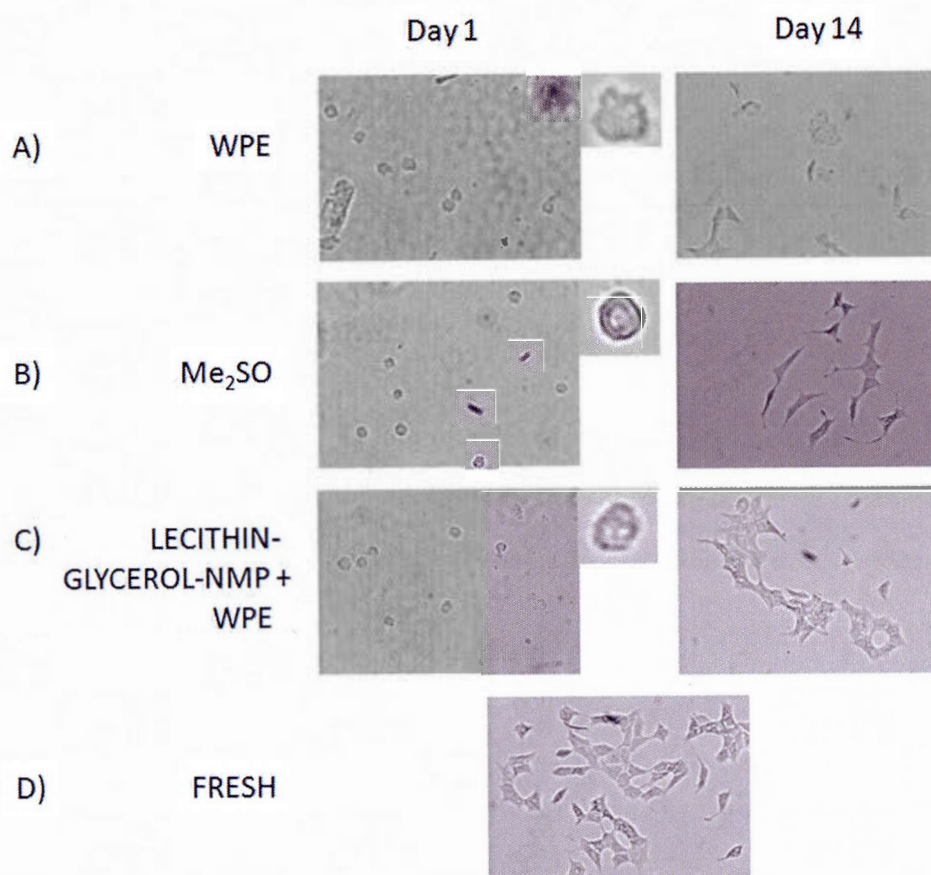
The authors would like to thank Dr. Marc Prentki, Director of the Montréal Diabetes Research Centre, for providing the INS832/13 cell line and Érik Joly for assistance with pancreatic metabolic function assays. We also thank Stephen Leong Koan and other undergraduate and graduate students who helped to prepare the plant protein extracts, and Amira Moheb for the GC/MS analysis. This work was funded by a Collaborative Health Research Project from the Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canadian Institutes of Health Research.

## 2.9 FIGURE CAPTIONS



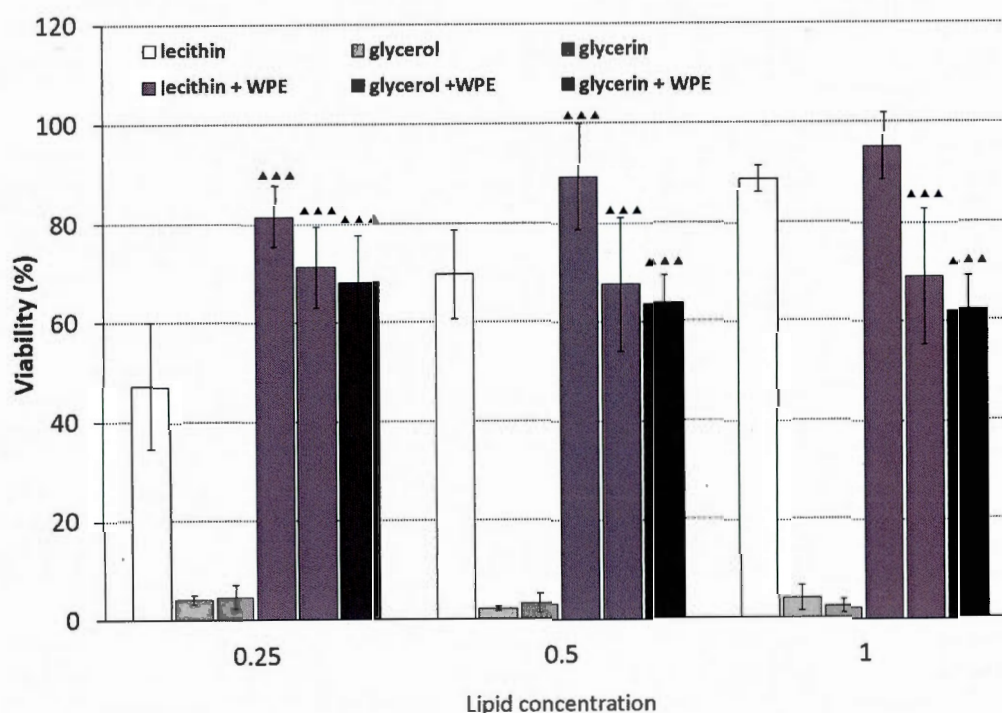
**Figure 2.1 A wheat protein extract (WPE) can replace Me<sub>2</sub>SO as a cryoprotectant for INS832/13 cells.** Cells were cryopreserved for 7 days with different concentrations of WPE, or with 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS (Me<sub>2</sub>SO) or RPMI or 20 mg BSA. Fresh cells served as control. Cells cryopreserved in complete RPMI culture medium, without proteins, served as negative control. Post-thaw viability was determined with SYTOX Green by flow cytometry. Data (mean  $\pm$  SEM) represent measurements of at least 3 different preparations of WPE tested on 3 independent cell preparations. \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indicates a significant increase in viability between cells cryopreserved with WPE versus those with Me<sub>2</sub>SO.



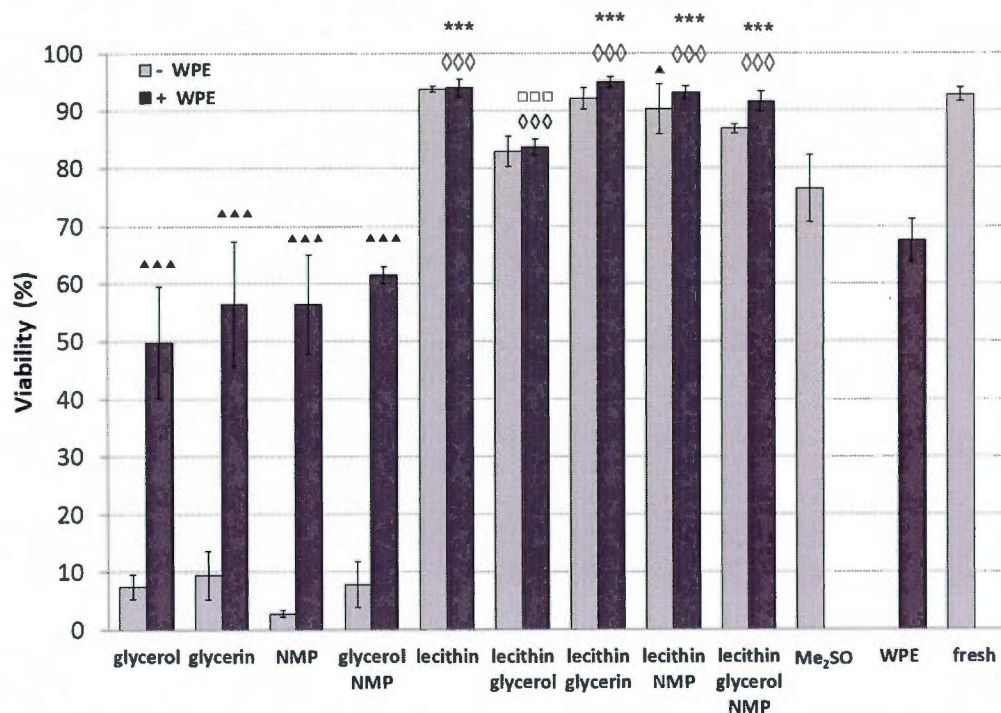


**Figure 2.2 Morphology of fresh and cryopreserved INS832/13 cells.** Cells were cryopreserved for 7 days with (A) 5 mg of WPE, or (B) 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS (Me<sub>2</sub>SO), or (C) were preincubated for 1 h with lecithin, glycerin or glycerol (1% each) prior to cryopreservation with 5 mg of WPE. (D) Fresh cells served as control. Due to lower adherence, larger quantities of cells cryopreserved with the WPE alone were plated on coverslips. Cellular morphology was visualized by microscopy (magnification 150X) after 1 day and 14 days of culture of thawed cells. Enlargements (further 5X) are shown for individual cells after 1 day of culture. Photographs are from one representative experiment, which was repeated at least three times.

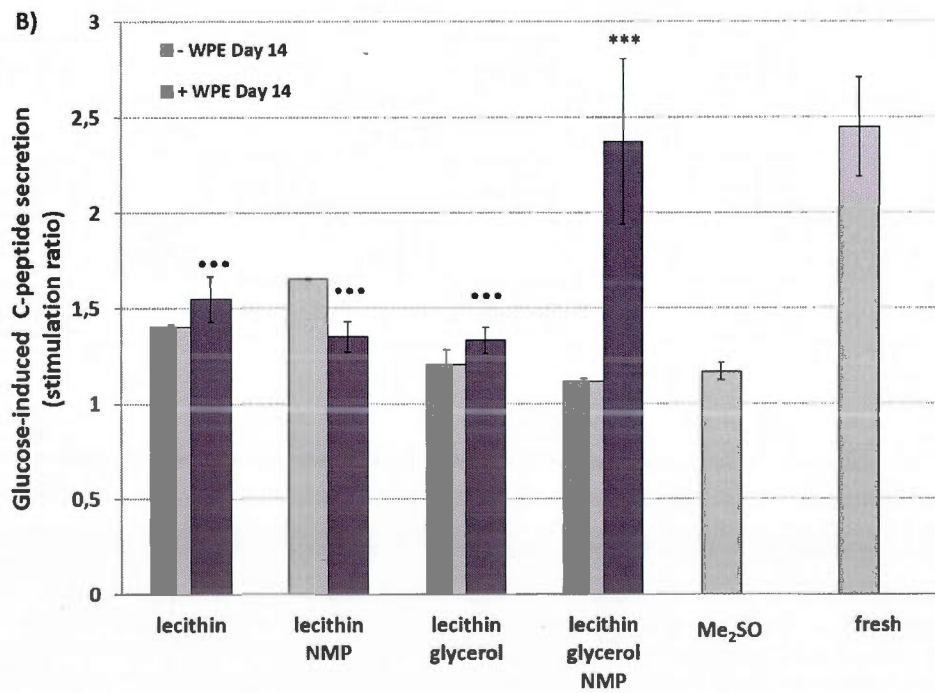
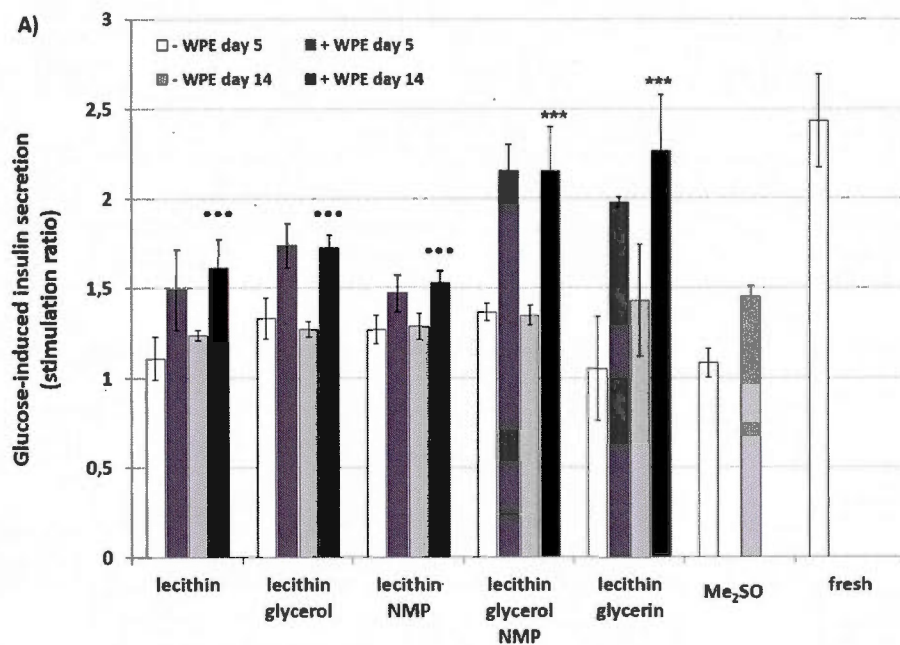




**Figure 2.3 Viability of INS832/13 cells cryopreserved with WPE is enhanced by preincubation with lipids.** Cells were preincubated for 1 h with lecithin, glycerin or glycerol at the indicated concentrations prior to cryopreservation with or without 5 mg of WPE for 7 days. Post-thaw viability was determined with SYTOX Green. Data (mean  $\pm$  SEM) represent measurements of at least 3 different preparations of WPE tested on 3 independent cell preparations. ▲▲▲ ( $P < 0.001$ ) indicates significant increases between cells cryopreserved with WPE versus those without WPE, for each lipid at each concentration.

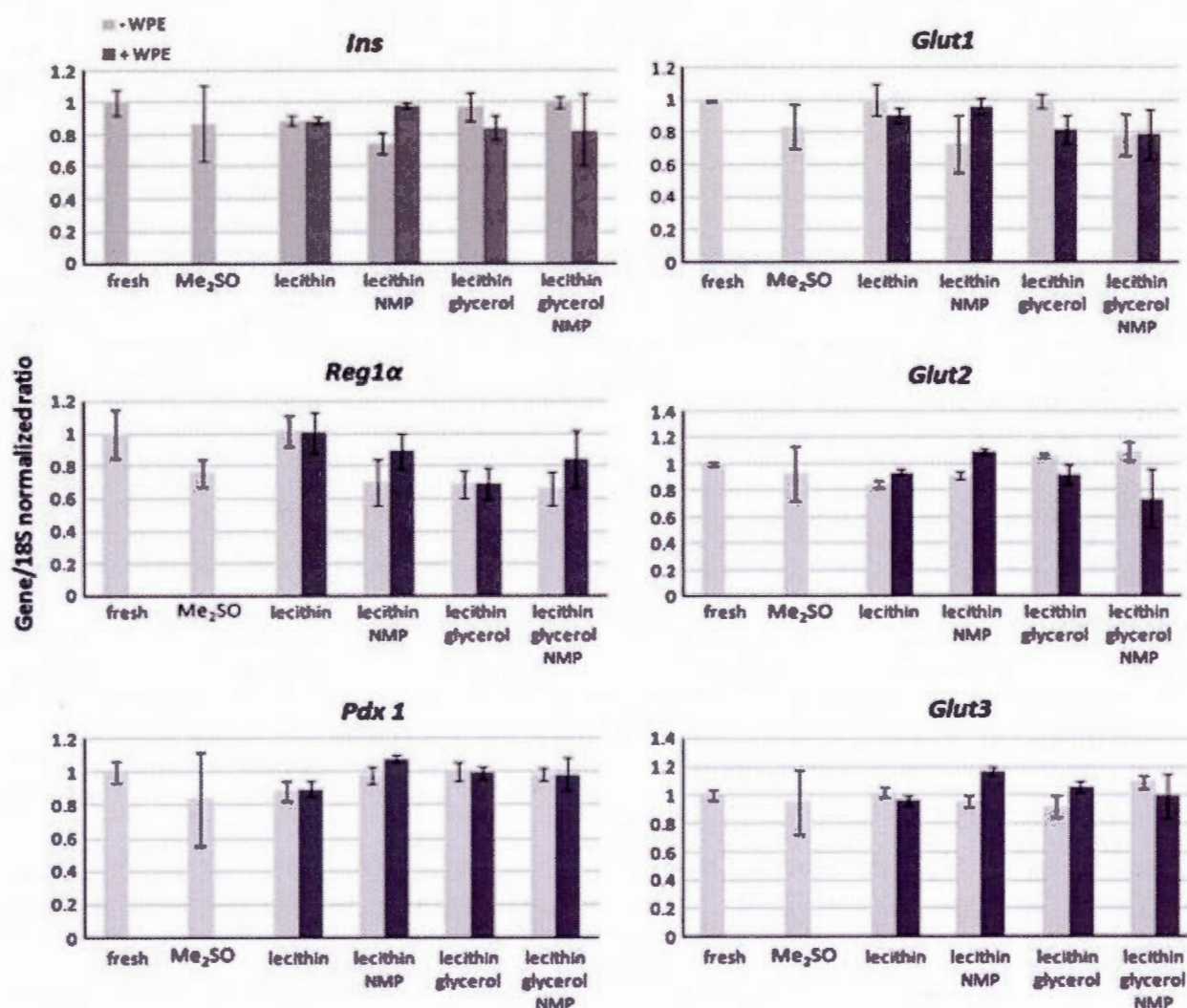


**Figure 2.4 Viability of INS832/13 cells cryopreserved with WPE is enhanced by preincubation with lipid-containing mixtures.** Cells were preincubated for 1 h with different combinations of lecithin, glycerol, glycerin and/or NMP (1% each) prior to cryopreservation with or without 5 mg of WPE for 7 days. Cells were also cryopreserved, without preincubation, with WPE alone or 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS (Me<sub>2</sub>SO). Post-thaw viability was determined with SYTOX Green. Data (mean  $\pm$  SEM) represent measurements of at least 3 different preparations of WPE tested on 3 independent cell preparations. ▲ (P<0.05) and ▲▲▲ (P<0.001) indicate a significant increase between cells cryopreserved with WPE versus those without WPE, for each lipid or mixture. \*\*\* (P<0.001) indicates a significant increase between cells cryopreserved with WPE versus those with Me<sub>2</sub>SO. □□□ (P<0.001) indicates a significant increase for cells cryopreserved with lecithin-glycerin-WPE versus those with lecithin-glycerol-WPE. ◇◇◇ (P<0.001) indicates a significant increase between cells cryopreserved with WPE-lipid mixtures versus those with WPE alone.

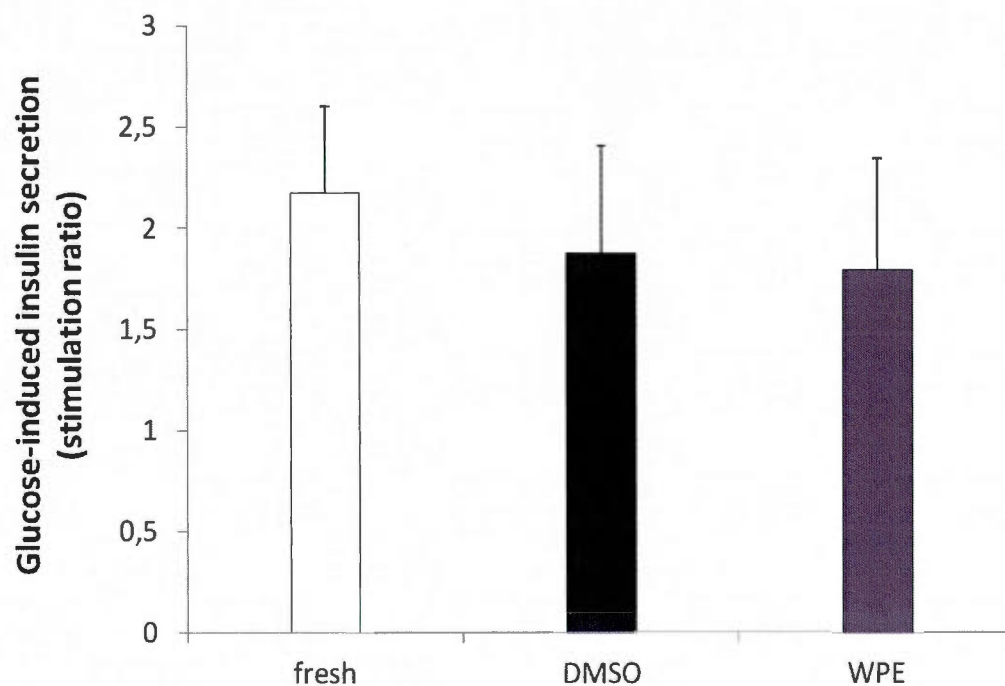


**Figure 2.5 Pancreas-associated metabolic activities are enhanced in INS832/13 cells cryopreserved with WPE and lipid-containing mixtures compared to Me<sub>2</sub>SO.** Cells were preincubated for 1 h with different combinations of lecithin, glycerol and/or NMP (1% each) prior to cryopreservation with or without 5 mg of WPE for 7 days. Cells were also cryopreserved with 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS (Me<sub>2</sub>SO). To eliminate traces of lecithin prior to plating and culture, thawed cells were washed immediately with 0.1% Tween-20 in PBS (pH 7.4). After thawing, cells were plated and allowed to adhere for 2 days, and then tested at days 5 and 14 post-adhesion. Glucose-induced secretion of insulin (A) and C-peptide (B) were quantified by ELISA and results expressed as the 15 mM/1 mM glucose stimulation ratio. Data (mean  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements of at least 3 different preparations of WPE tested on 3 independent cell preparations. Stimulation ratios in fresh cells are shown at day 14 and were similar to those at day 5. \*\*\* (P<0.001) indicates a significant increase between cells cryopreserved with WPE versus those with Me<sub>2</sub>SO. ●●● (P<0.001) indicates significantly lower insulin secretion for cells cryopreserved with different WPE-lipid combinations compared to the optimal WPE-lecithin-glycerol-NMP mixture.



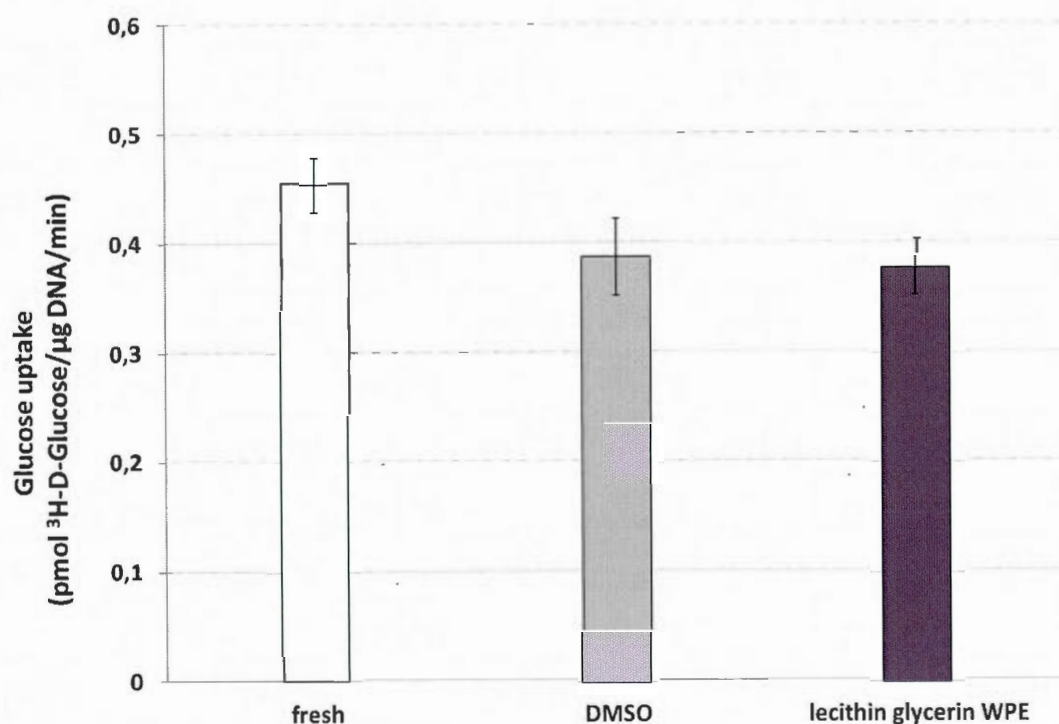


**Figure 2.6** Expression levels of genes associated with pancreatic metabolic functions in INS832/13 cells cryopreserved with the WPE formulation are similar to those of fresh cells. Cells were preincubated for 1 h with different combinations of lecithin, glycerol and/or NMP (1% each) prior to cryopreservation with 5 mg of WPE for 7 days. Cells were also cryopreserved with 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS (Me<sub>2</sub>SO). Fresh cells served as control. The levels of mRNA expression of genes for preproinsulin (*Ins*), regenerating islet-derived 1 alpha (*Reg1α*), pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx1*) and glucose transporters 1, 2 and 3 (*Glut1*, -2, -3) were determined by semi-quantitative RT-PCR. Data (means  $\pm$  SEM) represent duplicate measurements of at least three different preparations of WPE tested on 3 independent cell preparations. There were no significant differences between fresh and cryopreserved cells ( $P > 0.05$ ).

**2.10 FIGURE FOR SUPPLEMENTARY DATA**

**Figure 2.7 WPE does not affect insulin secretion of INS832/13 cells.** Fresh cells ( $5 \times 10^4$  cells) were preincubated with or without 10% Me<sub>2</sub>SO or 0.25 mg of WPE for 30 min. Cells were then plated and allowed to adhere for 24 h. Glucose-induced insulin secretion was determined by ELISA and expressed as the 15 mM/1 mM glucose stimulation ratio. Data (means  $\pm$  SEM) represent triplicate measurements of at least three different preparations of WPE. There were no significant differences between fresh and cryopreserved cells ( $P > 0.05$ ).





**Figure 2.8 Glucose uptake in INS832/13 cells cryopreserved with WPE and a lipid mixture is similar to fresh cells.** Cells were preincubated for 1 h with a mixture of lecithin and glycerin (1% each) prior to cryopreservation with 5 mg of WPE for 7 days. Cells were also cryopreserved with 10% Me<sub>2</sub>SO-50% FBS (Me<sub>2</sub>SO). Cells were tested for glucose uptake using [<sup>3</sup>H]-2-deoxy-glucose. Data (means ± SEM) represent quadruplicate measurements of at least three different preparations of WPE. There were no significant differences between fresh and cryopreserved cells ( $P > 0.05$ ).

**Supplementary Table S1: Primers used for gene expression analysis using semi-quantitative RT-PCR**

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>18S rRNA</i>	aaacggctaccacatccaag	cctccaatggatcctcgta
<i>Ins</i>	cagcaccttgtggttctca	cagtccaaggctctgaaggt
<i>Reg1A</i>	ccagaaggtccaatgccta	cagagaggccagaaagttgc
<i>Pdx1</i>	gctggagctggagaaggaat	cgttgctccgctactacgtt
<i>Glut1</i>	cttgtgtctgccgtgctta	cacatacatgggcacaaagc
<i>Glut2</i>	gctggaagaagcgtatcagg	aatcctgattgcccagaatg
<i>Glut3</i>	ctccgtgtcctccagttgt	gctccaccaggaacagagag

**Supplementary Table S2: Different buffers used to wash cells cryopreserved  
with WPEs immediately after thawing**

---

**Wash buffer**

---

PBS: 150 mM NaCl, 3.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7

PBS-KCl: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7

10% BSA in PBS, pH 7.4

200 mM sodium citrate, pH 5.5

200 mM sodium bicarbonate, pH 9.2

10 mM ascorbic acid in PBS, pH 7.4

10 mM Tris-sulfate, pH 7.4

10 mM Tris-HCl, 10 mM Na-EDTA, 0.5 mM EGTA, pH 8.0

10 mM Tris-HCl, 10 mM Na-EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1 % Tween-20, pH 8.0

150 mM Tris-HCl, 2.5 mM sucrose, 1% BSA, pH 7.4

0.1% polyvinylpyrrolidone in PBS, pH 7.4

0.25% trypsin-EDTA in PBS, pH 7.4

5 µg/ml proteinase K in 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4

0.1% pepsin in PBS, pH 7.4

0.01% pronase in PBS, pH 7.4

50 units/ml neuraminidase in PBS, pH 7.4

1 mg/ml collagenase in PBS, pH 7.4

0.05% NP-40 in PBS, pH 7.4

0.05% SDS in PBS, pH 7.4

0.05% saponin in PBS, pH 7.4

**0.1% Tween-20 in PBS, pH 7.4      Note: optimal washing buffer for INS832/13 cells**

---

Following cryopreservation with WPEs for 7 days, INS832/13 cells were suspended in 14 ml of indicated buffers and centrifuged at 1,500g for 5 min before plating in dishes in complete RPMI medium. Cells were observed for adherence and propagation in culture by microscopy, 48 h after plating.

**Supplementary Table S3: Influence of different oils on adherence and cell membrane protein coating of cells cryopreserved with WPEs or Me<sub>2</sub>SO**

Cryoprotectant	Cell viability (%)	Cell adherence	Cell coating
Fresh	100	Strong	-
Me <sub>2</sub> SO	65.49	Medium	-
WPE	67.44	Weak	<b>Yes</b>
Mineral oil-WPE	80.81	-	-
Nut oil-WPE	87.20	-	-
Peanut oil-WPE	92.18	-	-
Sunflower oil-WPE	91.80	-	-
Olive oil-WPE	15.76	-	-
Spearmint-WPE	19.82	-	-
Cotton seed oil-WPE	12.47	-	-
Clove oil-WPE	59.68	-	-
Mineral oil-Me <sub>2</sub> SO	76.92	-	-
Nut oil-Me <sub>2</sub> SO	78.14	-	-
Peanut oil-Me <sub>2</sub> SO	76.70	-	-
Sunflower oil-Me <sub>2</sub> SO	90.23	-	-
Olive oil-Me <sub>2</sub> SO	88.81	-	-
Spearmint-Me <sub>2</sub> SO	63.85	-	-
Cotton seed oil-Me <sub>2</sub> SO	58.80	-	-
Clove oil-Me <sub>2</sub> SO	65.46	-	-

Cells were pre-treated with different oils (0.5, 1 or 5%) before the addition of WPEs (5 mg) or 10% Me<sub>2</sub>SO. Immediately after thawing, cells were washed with 14 ml of PBS and centrifuged at 1,500g for 5 min before plating in dishes in complete RPMI medium. Cells were observed for adherence and membrane protein coating by microscopy, 48h after plating. Data are presented for 0.5% oil, and were similar with 1 or 5% oil.

## CONCLUSION ET PROSPECTIVES

Plusieurs études ont démontré que l'utilisation de cryoprotecteurs comme le DMSO, le 1,2-propanediol et le glycérol entraîne une toxicité biochimique et osmotique. La toxicité biochimique pourrait provenir d'interactions entre les cryoprotecteurs et les protéines membranaires, enzymatiques et cytosquelettiques ainsi qu'avec les microfilaments et les microtubules (Grondin, 2008). On peut réduire la toxicité biochimique sans l'éliminer complètement en minimisant le temps de contact avec le cryoprotecteur. La toxicité osmotique se manifeste, quant à elle, lors de l'ajout et du retrait du cryoprotecteur. Elle s'observe notamment après la décongélation, lors du retrait des substances cryoprotectrices. La cellule incorpore un cryoprotecteur pendant la congélation et lorsqu'elle est ensuite placée dans un milieu privé de cryoprotecteur, elle voit son volume augmenter par une entrée massive d'eau, cela peut aller jusqu'à son éclatement (Grondin, 2008 ; Meryman, 1966). Ces deux types de toxicité entraînent des pertes non négligeables de la viabilité des cellules post décongélation.

Il est également connu que lors de la cryoconservation, les cellules subissent des stress notoires. En effet, les méthodes communes de cryoconservation sont susceptibles d'engendrer des dommages cellulaires. Ainsi, les cellules subissent des stress à presque toutes les étapes, depuis leur détachement, en passant par la dissociation en cellules individuelles ou petits groupes de cellules et pendant la centrifugation avant d'être aliquoté dans les cryovials. Les cellules doivent ensuite être placées dans le milieu de congélation, lequel contient bien souvent un ou plusieurs agents cryoprotecteurs pouvant endommager de façon osmotique les cellules et/ou introduire une toxicité directement liée aux agents cryoprotecteurs. Pendant le refroidissement à des températures sous zéro, les membranes cellulaires

subissent une phase de transition des lipides, laquelle, si elle est suffisamment rapide, peut induire des blessures dues au froid. Ces faits concernent surtout les lignées cellulaires. Les stress sont quelque peu différents lorsque l'on aborde des cultures primaires telles les hépatocytes ou îlots de Langerhans.

Pendant la congélation, la viabilité des cellules peut aussi être compromise par la formation de glace intracellulaire si le refroidissement se produisant dans la gamme entre 0°C et -70°C est trop rapide ou si la vitesse de congélation est trop lente car les cellules rétrécissent tandis que la molalité en phase liquide augmente et que les températures chutent. Ce rétrécissement est éventuellement létal. Pendant l'entreposage, les cellules peuvent subir un cyclage thermique causé par le levage et la réimmersion dans le contenant de cryoconservation quand les échantillons dans le même contenant sont récupérés. Les cellules doivent être décongelées dans des conditions optimales (décongélation rapide à 37°C pendant moins d'une minute pour minimiser la formation de glace intracellulaire pendant le processus de réchauffement, dilution lente avec le milieu de culture approprié pour ne pas induire un choc osmotique causé par la présence de DMSO ou autre cryoprotecteur diffusible lequel diminuerait la survie des cellules par sa toxicité en prenant soin d'éviter toute contamination, centrifugation des cellules, récupération du culot et resuspension de ce dernier dans le milieu de culture pertinent à la lignée cellulaire utilisée, etc.) afin de prévenir le choc osmotique. Pour plusieurs types cellulaires, la vitesse de décongélation doit idéalement correspondre à la vitesse de congélation. Les cellules décongelées sont généralement remises en culture et peuvent subir une mort rapide (i.e, nécrotique) après avoir été incapables d'adhérer au substrat tandis que les cellules qui ont adhéré peuvent devenir apoptotiques (Katkov *et al.*, 2011). La capacité d'adhérer au substrat de culture post décongélation est une fonction capitale pour de nombreuses lignées cellulaires et certaines cultures primaires, c'est le cas des hépatocytes. Cela peut avoir un rôle très important pour d'éventuelles applications cliniques comme la transplantation. À titre d'exemple, les hépatocytes doivent



pouvoir s'attacher à l'endothélium hépatique sinusoidal dans le foie pendant le processus de greffe (Grondin *et al.*, 2009a ; Terry *et al.*, 2006). Toutefois, la capacité d'adhésion n'est pas un facteur critique pour toutes les cultures primaires. En effet, les îlots de Langerhans ne nécessitent pas de pouvoir adhérer à un substrat post-décongélation. Il importe donc de continuer à développer de nouvelles méthodes de cryoconservation avec moins d'effets toxiques et adaptées aux divers types cellulaires.

De ce fait, la méthode de cryoconservation suggérée et étudiée ici, basée sur les protéines de blé, s'est avérée efficace pour les hépatocytes et pour la lignée cellulaire pancréatique INS832/13 (formule légèrement modifiée) et elle pourra éventuellement être appliquée, modifiée et optimisée avec des îlots de Langerhans ou d'autres systèmes cellulaires. En effet, l'élaboration d'une méthode de cryoconservation moins toxique pour les îlots pancréatiques à l'aide de protéines végétales permettrait possiblement de récupérer un grand nombre d'îlots intacts et de conserver l'intégrité biologique et les fonctions pancréatiques endocrines de ces derniers. Ce pourrait être une avenue fort intéressante pour la médecine (ex : patients souffrant du diabète de type I, de mucoviscidose ou de pancréatite aiguë chronique). Une telle technique posséderait, de façon générale, sans doute moins d'impacts négatifs pour les cellules et permettrait la création de banques de cellules pour ultérieurement traiter un plus grand nombre de patients.

Il est également pertinent de rappeler que nous avons émis comme hypothèse que les extraits de protéines induites par le froid chez le blé d'hiver allaient avoir le potentiel d'améliorer la viabilité et les fonctions biologiques des cellules INS832/13 cryoconservées. Lors de nos premiers essais, l'extrait de protéines induites n'a pas démontré une meilleure efficacité de cryoconservation que l'extrait de protéines non induites. Nous savons que les extraits de protéines induites ou non induites avaient eu le même effet de cryoprotection chez les hépatocytes. Quant aux résultats obtenus

avec les cellules INS832/13, l'extrait de protéines non induites au froid conjugué à l'ajout de glycérine, lécithine et NMP pour les raisons explicitées dans l'article a démontré des propriétés de cryoconservation très intéressantes. Les mécanismes fondamentaux impliqués dans l'effet cryoprotecteur de la formulation de protéines de blé (WPE) demeurent inconnus à ce jour. Des études plus poussées devront d'ailleurs être effectuées afin de pouvoir les élucider. Il est difficile d'établir quels sont les processus responsables de cet effet cryoprotecteur car l'extrait de blé utilisé, suivi d'une purification partielle à l'acétone, est un mélange de nombreuses protéines. Il est donc probable que plusieurs mécanismes sont en jeu ici et il existe sans doute une action synergique entre les différents composés de la formulation. La lécithine, le glycérol et le NMP contribuent également à cette protection et les hypothèses quant à leur mode de fonctionnement respectif ont été abordées dans l'article. Les protéines de l'extrait étant relativement larges, nous ne savons pas si celles-ci peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules. Il semble toutefois peu probable qu'elles puissent franchir la barrière cytoplasmique. Ainsi, il est possible qu'elles exercent leurs effets cryoprotecteurs au niveau extracellulaire. Nous avons expliqué dans la partie discussion de l'article les mécanismes possibles par lesquels certaines protéines de l'extrait de blé (WPE) peuvent conférer un effet cryoprotecteur. Les extraits du blé d'hiver contiennent de nombreuses protéines différentes incluant des niveaux de base de plusieurs protéines associées à la tolérance au gel telles que les déhydrines (WCS120, WCS19, WCOR410) et des protéines antigel (AFP, i.e., TaIRI-2). Les déhydrines sont considérées comme pouvant potentiellement enrober les protéines cellulaires vitales et les protéger contre des changements de conformation ou l'agglomération sous des conditions de stress telle que la congélation (Houde *et al.*, 1995). La protéine TaIRI-2 peut inhiber la croissance de cristaux de glace au niveau extracellulaire, protégeant ainsi la membrane plasmique pendant la congélation (Tremblay *et al.*, 2005). D'autres protéines de l'extrait sont fort probablement impliquées dans l'effet cryoprotecteur mais leur identité reste à déterminer. Il sera pertinent de poursuivre les tests avec les extraits de protéines induites par le froid et

de comparer les résultats avec ceux obtenus à partir de l'extrait de protéines non induites par le froid. Dans le même ordre d'idée, est-ce que des extraits protéiques de blé de printemps pourraient avoir des effets similaires ? Des études d'immunodétection sur les extraits protéiques utilisés lors de cette étude pourraient être effectuées afin de vérifier la présence de protéines de tolérance au gel.

Dans le but d'identifier les protéines possédant une activité cryoprotectrice, les fractions des protéines de plante avec une plus grande activité pourraient être digérées avec de la trypsine, séparées par chromatographie en deux dimensions (2D-LC) et ensuite analysées par spectrophotométrie de masse en tandem (MS/MS). Les analyses MS/MS génèrent des informations de séquençage *de novo* qui peuvent être comparées avec des séquences disponibles de protéine dans des bases de données publiques, permettant l'identification basée sur l'homologie des protéines présentes dans les mélanges. Des données préliminaires obtenues par des analyses protéomiques indiquent qu'un extrait soluble de WPE partiellement extrait par sulfate d'ammonium est riche en protéines régulées par le froid, en chaperonines, en antioxydants, en phénylalanine ammonia-lyase (PAL), en émolase, en protéines de liaison à l'ARN et en plusieurs protéines inconnues. Des analyses supplémentaires sont requises afin de confirmer ces résultats et pour identifier d'autres protéines.

Les protéines recombinantes devront également être testées. Nous émettons l'hypothèse que les protéines recombinantes du blé et les protéines des plantes, en addition avec leur fonction en tant que protéines structurantes de la glace et agents stabilisants de la membrane, pourraient agir en procurant un effet antioxydant et une protection anti-apoptotique des cellules INS832/13 et éventuellement des îlots durant la cryoconservation.

Peu d'études existent actuellement sur les ERO (espèces réactives de l'oxygène) et la cryoconservation des îlots de Langerhans ou des cellules

pancréatiques. Ce sera donc une avenue à approfondir une fois que le protocole de cryoconservation à base de protéines de blé sera optimisé aux îlots. Beaucoup d'études ont cependant été effectuées sur la présence des ERO imputées à la cryoconservation dans d'autres systèmes comme le sperme. Les ERO agissent comme d'importants facteurs contribuant à la mort et au dysfonctionnement des îlots de pancréas (Kanitkar and Bhonde, 2008).

Il a été démontré que l'expression des protéines et des gènes des antioxydants tels la glutathion peroxydase (GPx), la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase est normalement très faible dans les îlots de rongeurs (Robertson and Harmon, 2007). En effet, les îlots de pancréas sont parmi les tissus présentant le moins d'activité et d'expression extrinsèque d'enzymes antioxydants (Grankvist *et al.*, 1981 ; Robertson and Harmon, 2007 ; Tiedge *et al.*, 1997).

Cela veut dire que les îlots de Langerhans seront probablement très sensibles aux blessures imposées par le stress oxydatif sous des conditions physiologiques normales et que cela risque de s'aggraver lors de la cryoconservation. De fortes teneurs en ERO sont reconnues pour réduire l'expression du gène de l'insuline et la sécrétion d'insuline et entraîner également des dommages aux îlots (phénomènes d'apoptose, mortalité, etc.) (Robertson and Harmon, 2007). Il serait donc fort intéressant d'inclure des antioxydants dans les stratégies développées dans le but d'améliorer la survie et l'activité métabolique des îlots après cryoconservation. Plusieurs études ont déjà démontré que la cryopréservation des îlots de Langerhans avec des antioxydants (tels que la curcumine et l'acide ascorbique) améliore la libération de l'insuline induite par le glucose et augmente le contenu en insuline comparativement au DMSO seul ou DMSO avec sérum de veau fœtal, solution UW, etc. (Arata *et al.*, 2004 ; Janjic *et al.*, 1996 ; Kanitkar and Bhonde, 2008).

La mort des cellules par apoptose a déjà été observée durant la cryoconservation du sperme (Said *et al.*, 2010), des cellules folliculaires (Zhang *et al.*, 2013), des cellules souches pluripotentes humaines (HPSCs) (Kurosawa, 2012), etc. Il serait bien de pousser plus loin les études sur l'implication de l'apoptose dans les mécanismes de toxicité cellulaire durant la cryoconservation. La cryoconservation pourrait endommager les membranes, activer les récepteurs de mort comme TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) et Fas (APO-1 ou CD95) ou induire l'apoptose via la voie mitochondriale ou suite à un stress du réticulum endoplasmique (RE).

Rappelons que le principal avantage à utiliser une technologie à base de plantes pour la cryoconservation de cellules ou de cultures primaires en alternative au DMSO est que l'extrait de protéines de blé est non toxique, exempt de gluten et de produits animaux.

À l'issue des résultats prometteurs obtenus ici avec la lignée cellulaire pancréatique INS832/13, nous sommes confiants que notre mélange pourra être adapté et optimisé à des cultures primaires d'îlots de Langerhans. La concrétisation d'un tel défi permettrait de pallier aux nombreuses contraintes énumérées dans l'introduction, notamment la rareté d'îlots viables, de qualité et fonctionnels et pourrait permettre le traitement plus efficace d'un plus grand nombre de patients diabétiques de type I, de personnes atteintes de mucoviscidose et de pancréatite aigue chronique.



## RÉFÉRENCES

- Adams, J. M. 2003. «Ways of dying: multiple pathways to apoptosis». *Genes Dev*, vol. 17, no 20, p. 2481-2495.
- Arata, T., T. Okitsu, T. Fukazawa, H. Ikeda, K. Kobayashi, C. Yong, Y. Kosaka, M. Narushima, J. Matsuoka, I. Yamamoto, N. Tanaka, J. R. Lakey et N. Kobayashi. 2004. «Maintenance of glucose-sensitive insulin secretion of cryopreserved human islets with University of Wisconsin solution and ascorbic acid-2 glucoside». *Artif Organs*, vol. 28, no 6, p. 529-536.
- Arav, A., Y. Zeron, S. B. Leslie, E. Behboodi, G. B. Anderson et J. H. Crowe. 1996. «Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes». *Cryobiology*, vol. 33, no 6, p. 589-599.
- Arterburn, L. M., J. Zurlo, J. D. Yager, R. M. Overton et A. H. Heifetz. 1995. «A morphological study of differentiated hepatocytes in vitro». *Hepatology*, vol. 22, no 1, p. 175-187.
- Asfari, M., D. Janjic, P. Meda, G. Li, P. A. Halban et C. B. Wollheim. 1992. «Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines». *Endocrinology*, vol. 130, no 1, p. 167-178.
- Bakhach, J., V. Casoli et J. C. Guimberteau. 2007. «[The cryopreservation of composite tissues: principle, literature review and preliminary results of our own experiments]». *Ann Chir Plast Esthet*, vol. 52, no 5, p. 531-547.
- Balamurugan, A. N., V. Kumaravel, S. Pugazhenthii et B. Naziruddin. 2012. «Islet cell biology, regeneration, and transplantation». *Int J Endocrinol*, vol. 2012, p. 139787.
- Ballinger, W. F., et P. E. Lacy. 1972. «Transplantation of intact pancreatic islets in rats». *Surgery*, vol. 72, no 2, p. 175-186.
- Bartels, D., et D. Nelson. 1994. «Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics». *Plant Cell Environ*, vol. 17, no 5, p. 659-667.
- Baust, J. G., et R. E. Lee. 1981. «Divergent mechanisms of frost-hardiness in two populations of the gall fly, *Eurosta solidaginis*». *J Insect Physiol*, vol. 27, p. 485-490.



- Baust, J. M., M. J. Vogel, R. Van Buskirk et J. G. Baust. 2001. «A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival». *Cell Transplant*, vol. 10, no 7, p. 561-571.
- Berney, T., S. Ferrari-Lacraz, L. Buhler, J. Oberholzer, N. Marangon, J. Philippe, J. Villard et P. Morel. 2009. «Long-term insulin-independence after allogeneic islet transplantation for type 1 diabetes: over the 10-year mark». *Am J Transplant*, vol. 9, no 2, p. 419-423.
- Bhathena, S. J., N. R. Voyles, H. K. Oie, S. S. Smith, A. F. Gazdar et L. Recant. 1980. «Glucagon secreting clones of rat islet cell tumor». *Horm Metab Res*, vol. 12, no 11, p. 632-633.
- Bonner-Weir, S., et G. C. Weir. 2005. «New sources of pancreatic beta-cells». *Nat Biotechnol*, vol. 23, no 7, p. 857-861.
- Breton, G., J. Danyluk, F. Ouellet et F. Sarhan. 2000. «Biotechnological applications of plant freezing associated proteins». *Biotechnol Annu Rev*, vol. 6, p. 59-101.
- Brisson, D., M. C. Vohl, J. St-Pierre, T. J. Hudson et D. Gaudet. 2001. «Glycerol: a neglected variable in metabolic processes?». *Bioessays*, vol. 23, no 6, p. 534-542.
- Bugos, R. C., A. D. Hieber et H. Y. Yamamoto. 1998. «Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants». *J Biol Chem*, vol. 273, no 25, p. 15321-15324.
- Cadieux, C., F. Sarhan et M. Perras. 1988. «Osmotic adjustment and photosynthetic electron transport response to cold hardening in winter and spring wheat». *Plant Physiol Biochem*, vol. 26, no 3, p. 313-322.
- Chen, H. H. , et P.H. Li. 1982. «Plant cold hardiness and freezing stress: mechanisms and crop Implications». P.H. Li. New-York, USA: Academic Press Ed. p. 5-22.
- Chick, W. L., S. Warren, R. N. Chute, A. A. Like, V. Lauris et K. C. Kitchen. 1977. «A transplantable insulinoma in the rat». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 74, no 2, p. 628-632.
- Crevel, R. W., J. K. Fedyk et M. J. Spurgeon. 2002. «Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure». *Food Chem Toxicol*, vol. 40, no 7, p. 899-903.

- Danyluk, J., A. Perron, M. Houde, A. Limin, B. Fowler, N. Benhamou et F. Sarhan. 1998. «Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat». *Plant Cell*, vol. 10, no 4, p. 623-638.
- Demel, R. A., et B. De Kruffyff. 1976. «The function of sterols in membranes». *Biochim Biophys Acta*, vol. 457, no 2, p. 109-132.
- Diller, K. R. 1990. «Coefficients for solution of the analytical freezing equation in the range of states for rapid solidification of biological systems». *Proc Inst Mech Eng H*, vol. 204, no 3, p. 199-202.
- Dominguez-Bendala, J., L. Inverardi et C. Ricordi. 2012. «Regeneration of pancreatic beta-cell mass for the treatment of diabetes». *Expert Opin Biol Ther*, vol. 12, no 6, p. 731-741.
- Doucet, D., M. G. Tyshenko, P. L. Davies et V. K. Walker. 2002. «A family of expressed antifreeze protein genes from the moth, *Choristoneura fumiferana*». *Eur J Biochem*, vol. 269, no 1, p. 38-46.
- Du, N., X. Y. Liu et C. L. Hew. 2003. «Ice nucleation inhibition: mechanism of antifreeze by antifreeze protein». *J Biol Chem*, vol. 278, no 38, p. 36000-36004.
- El-Shewy, H. M., W. F. Kendall, Jr., M. Darrabie, B. H. Collins et E. C. Opara. 2004. «Polyvinyl pyrrolidone: a novel cryoprotectant in islet cell cryopreservation». *Cell Transplant*, vol. 13, no 3, p. 237-243.
- Flower, D. R. 1996. «The lipocalin protein family: structure and function». *Biochem J*, vol. 318 ( Pt 1), p. 1-14.
- Fowler, D. B., Limin, A. E., Ritchie et J. T. 1999. «Low-temperature tolerance in cereals : Model and genetic interpretation». *Crop Science*, vol. 20, no 3, p. 298-309.
- Frenette Charron, J. B., G. Breton, M. Badawi et F. Sarhan. 2002. «Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*». *FEBS Lett*, vol. 517, no 1-3, p. 129-132. NLM.
- Golden, S. H. 2011. «Emerging therapeutic approaches for the management of diabetes mellitus and macrovascular complications». *Am J Cardiol*, vol. 108, no 3 Suppl, p. 59B-67B.

- Graham, J. K., et R. H. Foote. 1987a. «Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm: I. A fertility assay for fresh semen». *Gamete Res*, vol. 16, no 2, p. 133-145.
- Graham, J. K., et R. H. Foote. 1987b. «Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing». *Cryobiology*, vol. 24, no 1, p. 42-52.
- Grankvist, K., S. L. Marklund et I. B. Taljedal. 1981. «CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse». *Biochem J*, vol. 199, no 2, p. 393-398.
- Grondin, M. 2008. «Les protéines de blé d'hiver : nouveaux agents cryoprotecteurs pour les hépatocytes de rat.». Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, 255 p.
- Grondin, M., F. Hamel, D. A. Averill-Bates et F. Sarhan. 2009a. «Wheat proteins enhance stability and function of adhesion molecules in cryopreserved hepatocytes». *Cell Transplant*, vol. 18, no 1, p. 79-88.
- Grondin, M., F. Hamel, D. A. Averill-Bates et F. Sarhan. 2009b. «Wheat proteins improve cryopreservation of rat hepatocytes». *Biotechnol Bioeng*, vol. 103, no 3, p. 582-591.
- Grondin, M., F. Hamel, F. Sarhan et D. A. Averill-Bates. 2008. «Metabolic activity of cytochrome p450 isoforms in hepatocytes cryopreserved with wheat protein extract». *Drug Metab Dispos*, vol. 36, no 10, p. 2121-2129.
- Grondin, M., I. Robinson, S. Do Carmo, M. A. Ali-Benali, F. Ouellet, C. Mounier, F. Sarhan et D. A. Averill-Bates. 2013. «Cryopreservation of insulin-secreting INS832/13 cells using a wheat protein formulation». *Cryobiology*, vol. 66, no 2, p. 136-143.
- Guha, A., et R. Devireddy. 2010. «Polyvinylpyrrolidone (PVP) mitigates the damaging effects of intracellular ice formation in adult stem cells». *Ann Biomed Eng*, vol. 38, no 5, p. 1826-1835.
- Guy, C. . 1990. «Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 41, p. 187-223.

- Hamel, F., M. Grondin, F. DenizEAU, D. A. Averill-Bates et F. Sarhan. 2006. «Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes». *Biotechnol Bioeng*, vol. 95, no 4, p. 661-670.
- Harding, M. M., P. I. Anderberg et A. D. Haymet. 2003. «'Antifreeze' glycoproteins from polar fish». *Eur J Biochem*, vol. 270, no 7, p. 1381-1392.
- Hey, J. M., et D. R. MacFarlane. 1998. «Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2: ice crystal growth kinetics». *Cryobiology*, vol. 37, no 2, p. 119-130.
- Hohmeier, H. E., H. Mulder, G. Chen, R. Henkel-Rieger, M. Prentki et C. B. Newgard. 2000. «Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion». *Diabetes*, vol. 49, no 3, p. 424-430.
- Holovati, J. L., M. I. Gyongyossy-Issa et J. P. Acker. 2009. «Effects of trehalose-loaded liposomes on red blood cell response to freezing and post-thaw membrane quality». *Cryobiology*, vol. 58, no 1, p. 75-83.
- Houde, M., C. Daniel, M. Lachapelle, F. Allard, S. Laliberte et F. Sarhan. 1995. «Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues». *Plant J*, vol. 8, no 4, p. 583-593.
- Hubalek, Z. 2003. «Protectants used in the cryopreservation of microorganisms». *Cryobiology*, vol. 46, no 3, p. 205-229.
- Hughes, M. A., et M. A. Dunn. 1996. «The molecular biology of plant acclimation to low temperature». *J Exp Biol*, vol. 47, no 3, p. 291-305.
- Huner, N. P. A., G. Öquist et F. Sarhan. 1998. «Energy balance and acclimation to light and cold». *Trends Plant Sci*, vol. 3, no 6, p. 224-230.
- International Diabetes Federation. 2012. «The Challenge of Diabetes». En ligne. <[www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas)>.
- Jaenicke, R. 1991. «Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions». *Eur J Biochem*, vol. 202, no 3, p. 715-728.
- Jahansouza, C., S. C. Kumer, M. Ellenbogen et K. L. Brayman. 2011. «Evolution of beta-cell replacement therapy in diabetes mellitus: pancreas transplantation». *Diabetes Technol Ther*, vol. 13, no 3, p. 395-418.



- Janjic, D., E. Anderegg, S. Deng, C. Bartley, L. Buhler, P. Morel et C. B. Wollheim. 1996. «Improved insulin secretion of cryopreserved human islets by antioxidant treatment». *Pancreas*, vol. 13, no 2, p. 166-172.
- Jeerakathil, T., J. A. Johnson, S. H. Simpson et S. R. Majumdar. 2007. «Short-term risk for stroke is doubled in persons with newly treated type 2 diabetes compared with persons without diabetes: a population-based cohort study». *Stroke*, vol. 38, no 6, p. 1739-1743.
- Kabelitz, D., E. K. Geissler, B. Soria, I. S. Schroeder, F. Fandrich et L. Chatenoud. 2008. «Toward cell-based therapy of type I diabetes». *Trends Immunol*, vol. 29, no 2, p. 68-74.
- Kanitkar, M., et R. R. Bhonde. 2008. «Curcumin treatment enhances islet recovery by induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during cryopreservation». *Life Sci*, vol. 82, no 3-4, p. 182-189.
- Karlsson, J. O., E. G. Cravalho, I. H. Borel Rinkes, R. G. Tompkins, M. L. Yarmush et M. Toner. 1993. «Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide». *Biophys J*, vol. 65, no 6, p. 2524-2536.
- Karlsson, J. O., et M. Toner. 1996. «Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues». *Biomaterials*, vol. 17, no 3, p. 243-256.
- Katkov, I. I., N. G. Kan, F. Cimadamore, B. Nelson, E. Y. Snyder et A. V. Tersikh. 2011. «DMSO-Free Programmed Cryopreservation of Fully Dissociated and Adherent Human Induced Pluripotent Stem Cells». *Stem Cells Int*, vol. 2011, p. 1-8.
- Khan, A. H., et J. E. Pessin. 2002. «Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways». *Diabetologia*, vol. 45, no 11, p. 1475-1483.
- Kim, H. I., et Y. H. Ahn. 2004. «Role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells». *Diabetes*, vol. 53 Suppl 1, p. S60-65.
- Kimelberg, H. K. 1976. «Protein-liposome interactions and their relevance to the structure and function of cell membranes». *Mol Cell Biochem*, vol. 10, no 3, p. 171-190.

- Kimelberg, H. K. 1978. «Influence of lipid phase transitions and cholesterol on protein-lipid interaction». *Cryobiology*, vol. 15, no 2, p. 222-226.
- Knight, C. A., A. L. DeVries et L. D. Oolman. 1984. «Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice». *Nature*, vol. 308, no 5956, p. 295-296.
- Knight, C. A., J. Hallett et A. L. DeVries. 1988. «Solute effects on ice recrystallization: an assessment technique». *Cryobiology*, vol. 25, no 1, p. 55-60.
- Kurosawa, H. 2012. «Application of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor to human pluripotent stem cells». *J Biosci Bioeng*, vol. 114, no 6, p. 577-581.
- Lacotte, S., T. Berney, A. J. Shapiro et C. Toso. 2011. «Immune monitoring of pancreatic islet graft: towards a better understanding, detection and treatment of harmful events». *Expert Opin Biol Ther*, vol. 11, no 1, p. 55-66.
- Lacy, P. E., et M. Kostianovsky. 1967. «Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas». *Diabetes*, vol. 16, no 1, p. 35-39.
- Lahey, J. R., R. V. Rajotte, C. A. Fedorow et M. J. Taylor. 2001. «Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions». *Cell Transplant*, vol. 10, no 7, p. 583-589.
- Lahey, J. R., G. L. Warnock, N. M. Kneteman, Z. Ao et R. V. Rajotte. 1994. «Effects of pre-cryopreservation culture on human islet recovery and in vitro function». *Transplant Proc*, vol. 26, no 2, p. 820.
- Lecavalier, D., et W. J. Mackillop. 1985. «The effect of hyperthermia on glucose transport in normal and thermal-tolerant Chinese hamster ovary cells». *Cancer Lett*, vol. 29, no 2, p. 223-231.
- Leclere, M., B. K. Kwok, L. K. Wu, D. S. Allan et R. N. Ben. 2011. «C-linked antifreeze glycoprotein (C-AFGP) analogues as novel cryoprotectants». *Bioconjug Chem*, vol. 22, no 9, p. 1804-1810.
- Levesque-Tremblay, G., M. Havaux et F. Ouellet. 2009. «The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects Arabidopsis against oxidative stress». *Plant J*, vol. 60, no 4, p. 691-702.
- Levin, R. L., E. G. Cravalho et C. E. Huggins. 1976. «A membrane model describing the effect of temperature on the water conductivity of erythrocyte membranes at subzero temperatures». *Cryobiology*, vol. 13, no 4, p. 415-429.



- Li, S., J. H. Zhao, J. Luan, C. Langenberg, R. N. Luben, K. T. Khaw, N. J. Wareham et R. J. Loos. 2011. «Genetic predisposition to obesity leads to increased risk of type 2 diabetes». *Diabetologia*, vol. 54, no 4, p. 776-782.
- Maruyama, M., Kenmochi, T., Sakamoto, K., Arita, S., Iwashita, C and, et H. Kashiwabara. 2004. «Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants». *Transplant Proc*, vol. 36, p. 1133-1134.
- Massin, P., D. Dubois-Laforgue, T. Meas, M. Laloi-Michelin, H. Gin, B. Bauduceau, C. Bellanne-Chantelot, E. Bertin, J. F. Blickle, B. Bouhanick, J. Cahen-Varsaux, S. Casanova, G. Charpentier, P. Chedin, O. Dupuy, A. Grimaldi, B. Guerci, E. Kaloustian, A. Lecleire-Collet, F. Lorenzini, A. Murat, H. Narbonne, F. Olivier, V. Paquis-Flucklinger, M. Virally, M. Vincenot, B. Vialettes, J. Timsit et P. J. Guillausseau. 2008. «Retinal and renal complications in patients with a mutation of mitochondrial DNA at position 3,243 (maternally inherited diabetes and deafness). A case-control study». *Diabetologia*, vol. 51, no 9, p. 1664-1670.
- Matsumoto, S., M. Matsusita, T. Morita, H. Kamachi, S. Tsukiyama, Y. Furukawa, S. Koshida, Y. Tachibana, S. Nishimura et S. Todo. 2006. «Effects of synthetic antifreeze glycoprotein analogue on islet cell survival and function during cryopreservation». *Cryobiology*, vol. 52, no 1, p. 90-98.
- Matsumoto, S., T. Okitsu, Y. Iwanaga, H. Noguchi, H. Nagata, Y. Yonekawa, Y. Yamada, Y. Nakai, M. Ueda, A. Ishii, E. Yabunaka, J. A. Shapiro et K. Tanaka. 2005. «Insulin independence of unstable diabetic patient after single living donor islet transplantation». *Transplant Proc*, vol. 37, no 8, p. 3427-3429.
- Mazur, P. 1984. «Freezing of living cells: mechanisms and implications». *Am J Physiol*, vol. 247, no 3 Pt 1, p. C125-142.
- McKay, D. B., et A. M. Karow, 1983a. «A functional analysis on isolated rat islets of Langerhans: effects of dimethylsulfoxide and low-temperature preservation». *Cryobiology*, vol. 20, no 1, p. 41-50.
- McKay, D. B., et A. M. Karow, Jr. 1983b. «Factors to consider in the assessment of viability of cryopreserved islets of Langerhans». *Cryobiology*, vol. 20, no 2, p. 151-160.

- McNeil, S. D., M. L. Nuccio et A. D. Hanson. 1999. «Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance». *Plant Physiol*, vol. 120, no 4, p. 945-950.
- Melton, D. 1997. «Signals for tissue induction and organ formation in vertebrate embryos». *Harvey Lect*, vol. 93, p. 49-64.
- Meryman, H. T. 1966. «The interpretation of freezing rates in biological materials». *Cryobiology*, vol. 2, no 4, p. 165-170.
- Muller, Y. D., S. Gupta, P. Morel, S. Borot, F. Bettens, M. E. Truchetet, J. Villard, J. D. Seebach, D. Holmberg, C. Toso, J. A. Lobrinus, D. Bosco et T. Berney. 2013. «Transplanted human pancreatic islets after long-term insulin independence». *Am J Transplant*, vol. 13, no 4, p. 1093-1097.
- N'Dong, C., J. Danyluk, K. E. Wilson, T. Pocock, N. P. Huner et F. Sarhan. 2002. «Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses». *Plant Physiol*, vol. 129, no 3, p. 1368-1381.
- Nash, T., J. R. Postgate et J. R. Hunter. 1963. «Similar effects of various neutral solutes on the survival of aerobacter aerogenes and of red blood cells after freezing and thawing». *Nature*, vol. 199, p. 1113.
- Nishida, I., et N. Murata. 1996. «Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 47, p. 541-568.
- Noctor, G., et C. H. Foyer. 1998. «Ascorbate and glutathioné: keeping active oxygen under control». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 49, p. 249-279.
- Nolan, C. J., J. L. Leahy, V. Delghingaro-Augusto, J. Moibi, K. Soni, M. L. Peyot, M. Fortier, C. Guay, J. Lamontagne, A. Barbeau, E. Przybytkowski, E. Joly, P. Masiello, S. Wang, G. A. Mitchell et M. Prentki. 2006. «Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling». *Diabetologia*, vol. 49, no 9, p. 2120-2130.
- Nordlie, R. C., J. D. Foster et A. J. Lange. 1999. «Regulation of glucose production by the liver». *Annu Rev Nutr*, vol. 19, p. 379-406.
- Omori, K., L. Valiente, C. Orr, J. Rawson, K. Ferreri, I. Todorov, I. H. Al-Abdullah, S. Medicherla, A. A. Potter, G. F. Schreiner, F. Kandeel et Y. Mullen. 2007.

- «Improvement of human islet cryopreservation by a p38 MAPK inhibitor». *Am J Transplant*, vol. 7, no 5, p. 1224-1232.
- Palasz, A. T., et R. J. Mapletoft. 1996. «Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances». *Biotechnol Adv*, vol. 14, no 2, p. 127-149.
- Pegg, D. E. 2002. «The history and principles of cryopreservation». *Semin Reprod Med*, vol. 20, no 1, p. 5-13.
- Perras, M., et F. Sarhan. 1984. «Energy state of spring and winter wheat during cold hardening. Soluble sugars and adenine nucleotides.». *Physiologia Plantarum*, vol. 60, p. 129-132.
- Pervaiz, S., et K. Brew. 1985. «Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC». *Science*, vol. 228, no 4697, p. 335-337.
- Pikal-Cleland, K. A., N. Rodriguez-Hornedo, G. L. Amidon et J. F. Carpenter. 2000. «Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric beta-galactosidase». *Arch Biochem Biophys*, vol. 384, no 2, p. 398-406.
- Poitout, V., et R. P. Robertson. 1996. «An integrated view of beta-cell dysfunction in type-II diabetes». *Annu Rev Med*, vol. 47, p. 69-83.
- Polge, C., A. U. Smith et A. S. Parkes. 1949. «Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures». *Nature*, vol. 164, no 4172, p. 666.
- Prentki, M., et C. J. Nolan. 2006. «Islet beta cell failure in type 2 diabetes». *J Clin Invest*, vol. 116, no 7, p. 1802-1812.
- Rajotte, R. V. 1999. «Islet cryopreservation protocols». *Ann N Y Acad Sci*, vol. 875, p. 200-207.
- Rajotte, R. V., M. G. Evans, G. L. Warnock et N. M. Kneteman. 1990. «Islet cryopreservation». *Horm Metab Res Suppl*, vol. 25, p. 72-81.
- Rall, W. F., P. Mazur et H. Souzu. 1978. «Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol». *Biophys J*, vol. 23, no 1, p. 101-120. NLM.
- Rao, M. S., R. S. Dwivedi, V. Subbarao, M. I. Usman, D. G. Scarpelli, M. R. Nemali, A. Yeldandi, S. Thangada, S. Kumar et J. K. Reddy. 1988. «Almost total

- conversion of pancreas to liver in the adult rat: a reliable model to study transdifferentiation». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 156, no 1, p. 131-136.
- Rao, M. S., et J. K. Reddy. 1995. «Hepatic transdifferentiation in the pancreas». *Semin Cell Biol*, vol. 6, no 3, p. 151-156.
- Raymond, J. A., et A. L. DeVries. 1977. «Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes». *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 74, no 6, p. 2589-2593.
- Reader, S., M. Marion et F. Denizeau. 1993. «Flow cytometric analysis of the effects of tri-n-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes». *Toxicology*, vol. 80, no 2-3, p. 117-129.
- Rich, S. J., S. Swift, S. M. Thirdborough, R. F. James, P. R. Bell et N. J. London. 1994. «Islet cryopreservation: a detailed study of total functional losses». *Transplant Proc*, vol. 26, no 2, p. 823-824.
- Robertson, R. P., et J. S. Harmon. 2007. «Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase». *FEBS Lett*, vol. 581, no 19, p. 3743-3748. NLM.
- Rubinsky, B., A. Arav et G. L. Fletcher. 1991. «Hypothermic protection--a fundamental property of "antifreeze" proteins». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 180, no 2, p. 566-571.
- Russ, H. A., et S. Efrat. 2011. «Development of human insulin-producing cells for cell therapy of diabetes». *Pediatr Endocrinol Rev*, vol. 9, no 2, p. 590-597.
- Ryan, J. (2004). Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animales, Corning Incorporated Life Sciences: 1-10 p
- Said, T. M., A. Gaglani et A. Agarwal. 2010. «Implication of apoptosis in sperm cryoinjury». *Reprod Biomed Online*, vol. 21, no 4, p. 456-462.
- Sakata, N., G. Yoshimatsu, H. Tsuchiya, S. Egawa et M. Unno. 2012. «Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation». *Exp Diabetes Res*, vol. 2012, p. 1-11.
- Scharp, D. W., P. E. Lacy, J. V. Santiago, C. S. McCullough, L. G. Weide, L. Falqui, P. Marchetti, R. L. Gingerich, A. S. Jaffe, P. E. Cryer et et al. 1990. «Insulin

independence after islet transplantation into type I diabetic patient». *Diabetes*, vol. 39, no 4, p. 515-518.

Shapiro, A. M., J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbutt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman et R. V. Rajotte. 2000. «Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen». *N Engl J Med*, vol. 343, no 4, p. 230-238.

Shapiro, A. M., C. Ricordi, B. J. Hering, H. Auchincloss, R. Lindblad, R. P. Robertson, A. Secchi, M. D. Brendel, T. Berney, D. C. Brennan, E. Cagliero, R. Alejandro, E. A. Ryan, B. DiMercurio, P. Morel, K. S. Polonsky, J. A. Reems, R. G. Bretzel, F. Bertuzzi, T. Froud, R. Kandaswamy, D. E. Sutherland, G. Eisenbarth, M. Segal, J. Preiksaitis, G. S. Korbutt, F. B. Barton, L. Viviano, V. Seyfert-Margolis, J. Bluestone et J. R. Lakey. 2006. «International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation». *N Engl J Med*, vol. 355, no 13, p. 1318-1330.

Sidebottom, C., S. Buckley, P. Pudney, S. Twigg, C. Jarman, C. Holt, J. Telford, A. McArthur, D. Worrall, R. Hubbard et P. Lillford. 2000. «Heat-stable antifreeze protein from grass». *Nature*, vol. 406, no 6793, p. 256.

Siminovitch, D.; Cloutier, Y. 1982. «Twenty-four-hour induction of freezing and drought tolerance in plumules of winter rye seedlings by desiccation stress at room temperature in the dark». *Plant Physiol*, vol. 69, no 1, p. 250-255.

Stiegler, P. B., V. Stadlbauer, S. Schaffellner, G. Halwachs, C. Lackner, O. Hauser, F. Iberer et K. Tscheliessnigg. 2006. «Cryopreservation of insulin-producing cells microencapsulated in sodium cellulose sulfate». *Transplant Proc*, vol. 38, no 9, p. 3026-3030.

Stoll, C., H. Stadnick, O. Kollas, J. L. Holovati, B. Glasmacher, J. P. Acker et W. F. Wolkers. 2011. «Liposomes alter thermal phase behavior and composition of red blood cell membranes». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1808, no 1, p. 474-481.

Storey, B. T., E. E. Noiles et K. A. Thompson. 1998. «Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation». *Cryobiology*, vol. 37, no 1, p. 46-58.

Storey, K. B., et J.M. Storey. 1992. *Biochemical adaptations for winter survival in insects*. Coll. «*Advances in Low-temperature*». London: JAI Press p.



- Tahergorabi, Z., et M. Khazaei. 2012. «Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms». *Int J Prev Med*, vol. 3, no 12, p. 827-838.
- Taylor, M. J., et S. Baicu. 2009. «Review of vitreous islet cryopreservation: Some practical issues and their resolution». *Organogenesis*, vol. 5, no 3, p. 155-166.
- Terry, C., A. Dhawan, R. R. Mitry et R. D. Hughes. 2006. «Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art». *Cryobiology*, vol. 53, no 2, p. 149-159.
- Thomashow, M. F. 1999. «Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms». *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, vol. 50, p. 571-599.
- Thomashow, M. F. 2001. «So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots!». *Plant Physiol*, vol. 125, no 1, p. 89-93.
- Thomashow, Michael F. 1990. «Molecular genetics of cold acclimation in higher plants». *Advances in Genetics*, vol. 28, p. 99-131.
- Tiedge, M., S. Lortz, J. Drinkgern et S. Lenzen. 1997. «Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells». *Diabetes*, vol. 46, no 11, p. 1733-1742.
- Tremblay, K., F. Ouellet, J. Fournier, J. Danyluk et F. Sarhan. 2005. «Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals». *Plant Cell Physiol*, vol. 46, no 6, p. 884-891.
- Trunova, T. I. . 1982. «Mechanism of winter wheat hardening at low temperature ». P.H. Li. Academic Press, New-York, USA. p. 41-54.
- Uemura, M., et P. L. Steponkus. 1994. «A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance». *Plant Physiol*, vol. 104, no 2, p. 479-496.
- Van den Driessche, A., V. Eenkhoorn, L. Van Gaal et C. De Block. 2009. «Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review». *Neth J Med.*, vol. 67, no 11, p. 376-387.
- Vartapetian, Boris B., et Michael B. Jackson. 1997. «Plant adaptations to anaerobic stress». *Ann Botany*, vol. 79, no suppl 1, p. 3-20.



- Warnock, G. L., J. R. Lakey, Z. Ao et R. V. Rajotte. 1994. «Tissue banking of cryopreserved islets for clinical islet transplantation». *Transplant Proc*, vol. 26, no 6, p. 3438.
- Warnock, G. L., et R. V. Rajotte. 1992. «Pancreatic islet cell transplantation: A new era in transplantation». *Can Fam Physician*, vol. 38, p. 1655-1660.
- Weir, G. C., et S. Bonner-Weir. 1997. «Scientific and political impediments to successful islet transplantation». *Diabetes*, vol. 46, no 8, p. 1247-1256.
- Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus et G. N. Somero. 1982. «Living with water stress: evolution of osmolyte systems». *Science*, vol. 217, no 4566, p. 1214-1222.
- Zhang, Jian-Min, Heng-Cai Wang, Hong-Xia Wang, Li-Hong Ruan, Yi-Ming Zhang, Jun-Tao Li, Shan Tian et Ying-Chun Zhang. 2013. «Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells». *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*, vol. 166, no 1, p. 52-55.